

UNIVERSITE DE SHERBROOKE

MODULATION D'EXPRESSION DU CD23 ET DU IL2R β SUR LES
MONOCYTES ET LES LYMPHOCYTES HUMAINS PAR DES MEDiateURS
LIPIDIQUES (PAF, LTB₄) ET DES CYTOKINES (IL-4, IFN γ)

par

NATHALIE GAGNON, B.SC.

Département de Pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)

novembre 1992



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services Branch

395 Wellington Street
Ottawa, Ontario
K1A 0N4

Bibliothèque nationale
du Canada

Direction des acquisitions et
des services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa (Ontario)
K1A 0N4

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted an irrevocable non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of his/her thesis by any means and in any form or format, making this thesis available to interested persons.

L'auteur a accordé une licence irrévocable et non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de sa thèse de quelque manière et sous quelque forme que ce soit pour mettre des exemplaires de cette thèse à la disposition des personnes intéressées.

The author retains ownership of the copyright in his/her thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège sa thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

ISBN 0-315-89946-8

Canada

A Alain et à Marilou,
pour leur encouragement
et leur compréhension...

RESUME

Depuis quelques années, le groupe de Rola-Pleszczynski a mis en évidence le potentiel d'immunorégulation du leucotriène B₄ (LTB₄). Par exemple, il a démontré différents effets du LTB₄ sur le mécanisme de cytotoxicité des lymphocytes et des monocytes humains. L'activité cytotoxique des lymphocytes, en particulier les cellules NK (CD56⁺) et des monocytes, est également augmentée par IL-2. On sait maintenant que la chaîne β du récepteur de l'IL-2 (IL2R β) est responsable de cet effet. A partir de ces données, nous avons étudié 1° l'effet du LTB₄ sur l'activité cytotoxique des lymphocytes stimulés par IL-2, 2° le pouvoir modulateur de LTB₄ sur l'expression du IL2R β à la surface des lymphocytes et des monocytes et 3° le pouvoir modulateur du LTB₄ sur l'accumulation de l'ARNm du IL2R β chez les lymphocytes. Nous observons que le LTB₄ augmente l'accumulation de l'ARNm du IL2R β chez les lymphocytes et augmente l'expression du IL2R β à la surface des lymphocytes, en particulier ceux ayant une activité dite "natural killer" (NK). Ces dernières, lors d'un essai de cytotoxicité, deviennent plus sensibles à l'IL-2 lorsque prétraitées au LTB₄. Nous obtenons également une augmentation d'expression du IL2R β chez les monocytes par le LTB₄. De plus nous avons étudié l'effet du LTB₄ et du PAF sur l'expression de l'antigène CD23, un récepteur des IgE, sur les monocytes et les cellules U937. Nous n'avons observé aucun pouvoir modulateur de ces médiateurs lipidiques sur le CD23 comparativement à l'IL-4 et l'IFN γ qui eux augmentent l'expression du CD23.

Les résultats obtenus montrent la modulation d'expression d'un récepteur de cytokine (IL2R β) et d'un récepteur d'immunoglobuline (CD23) par différentes cytokines et médiateurs lipidiques est soumise à des mécanismes différents.

TABLE DES MATIERES

Résumé.....	II
Table des matières.....	III
Liste des illustrations.....	VII
Liste des tableaux.....	X
Liste des abréviations.....	XI

1. INTRODUCTION

1.1	Système immunitaire.....	1
1.2	Monocytes.....	3
1.3	Lymphocytes.....	6
1.4	LGLs.....	8
1.5	Interleukine 2.....	10
1.6	Leucotriène B ₄	17
1.7	PAF.....	20
1.8	Récepteur de faible affinité des IgE.....	24
1.9	But du projet.....	28

2. MATERIEL ET METHODES

2.1	Milieu de culture.....	30
-----	------------------------	----

2.2	Réactifs	
2.2.1	Lipides bioactifs.....	30
2.2.2	Anticorps monoclonaux.....	31
2.2.3	Mitogène et cytokines recombinantes.....	31
2.3	Cultures cellulaires	
2.3.1	Cellules de la lignée U937.....	32
2.3.2	Cellules de la lignée K562.....	33
2.3.3	Cellules BHK.....	33
2.4	Techniques expérimentales	
2.4.1	Séparation des leucocytes mononucléaires du sang périphérique (PBML).....	35
2.4.2	Cytofluorométrie.....	36
2.4.3	Buvar dage Northern.....	38
2.4.4	Essai de cytotoxicité.....	40
2.5	Analyse statistique.....	42

3.	RESULTATS	
3.1	Effet du LTB ₄ sur l'activité NK des lymphocytes humains stimulé par l'IL-2.....	43
3.2	Effet du LTB ₄ sur l'expression du IL2R β chez des lymphocytes humains	
3.2.1	Lymphocytes.....	45
3.2.2	Sous-populations lymphocytaires.....	47
3.3	Cinétique de l'expression du IL2R β chez les lymphocytes préincubés avec du LTB ₄	50
3.4	Effet du LTB ₄ sur l'expression de l'ARNm du IL2R β chez les lymphocytes humains.....	50
3.5	Effet du LTB ₄ sur les niveaux d'expression du IL2R β chez les monocytes humains.....	52
3.6	Effet du LTB ₄ et du PAF sur l'expression de CD23	
3.6.1	Monocytes humains.....	56
3.6.2	Les cellules U937.....	59
3.7	Effet de l'IL-4 et de l'IFN γ sur l'expression de CD23 chez une patiente atteinte du syndrome de Job-Buckley (hyper IgE).....	65
4.	DISCUSSION.....	67

5.	CONCLUSIONS.....	77
6.	ANNEXE.....	80
7.	REMERCIEMENTS.....	81
8.	REFERENCES.....	82

LISTE DES ILLUSTRATIONS

FIGURE 1	Récepteur de l'IL-2.....	16
FIGURE 2	Effet du LTB ₄ sur l'activité NK des lymphocytes humains stimulées par l'IL-2.....	44
FIGURE 3	Effet du LTB ₄ sur l'expression du IL-2R β chez des lymphocytes humains.....	46
FIGURE 4	Effet de l'IL-4 et de la PHA sur l'expression du IL-2R β chez des lymphocytes humains.....	48
FIGURE 5A	Effet du LTB ₄ sur l'expression du IL-2R β chez les différentes sous-populations lymphocytaires humaines.....	49
FIGURE 5B	Effet du LTB ₄ sur l'expression du IL-2R β chez les différentes sous-populations lymphocytaires humaines.....	49
FIGURE 5C	Effet du LTB ₄ sur l'expression du IL-2R β chez les différentes sous-populations lymphocytaires humaines.....	49

FIGURE 6A	Cinétique de l'expression du IL-2R β chez les lymphocytes humains traités au LTB ₄	51
FIGURE 6B	Cinétique de l'expression du IL-2R β chez les lymphocytes humains traités au LTB ₄	51
FIGURE 7	Effet du LTB ₄ sur l'expression de l'ARNm du IL-2R β chez des lymphocytes humains.....	53
FIGURE 8	Effet du LTB ₄ sur l'expression du IL-2R β chez des monocytes humains.....	54
FIGURE 9	Effet de l'IL-4 et de la PHA sur l'expression du IL-2R β chez des monocytes humains.....	55
FIGURE 10A	Cinétique de l'expression de IL-2R β chez des monocytes humains.....	57
FIGURE 10B	Cinétique de l'expression de IL-2R β chez des monocytes humains.....	57
FIGURE 11A	Effet de l'IL-4 et de l'IFN γ sur l'expression de CD23 chez les monocytes humains.....	60

FIGURE 11B Effet de l'IL-4 et de l'IFN γ sur l'expression de CD23 chez les monocytes humains.....	60
FIGURE 12 Effet de l'IL-4 et de l'IFN γ seuls ou combinés, sur l'expression de CD23 chez les monocytes humains.....	61
FIGURE 13A Effet de l'IL-4 et de l'IFN γ sur l'expression de CD23 chez des cellules U937.....	63
FIGURE 13B Effet de l'IL-4 et de l'IFN γ sur l'expression de CD23 chez des cellules U937.....	63
FIGURE 14 Effet de l'IL-4 et de l'IFN γ seuls ou combinés, sur l'expression de CD23 chez des cellules U937.....	64
FIGURE 15 Effet de l'IL-4 et de l'IFN γ sur l'expression de CD23 chez des monocytes d'une patiente atteinte du syndrome de Job-Buckley.....	66
FIGURE 16 Voie d'activation des lymphocytes humains traités au LTB $_4$	71

LISTES DES TABLEAUX

TABLEAU 1 Expression et fonction du CD23 membranaire dans divers types cellulaires.....	27
TABLEAU 2 Effet du PAF et du LTB ₄ sur l'expression de CD23 chez les monocytes humains et les cellules U937.....	58

LISTE DES ABREVIATIONS

a.a	= acide aminé
ARNm	= acide ribonucléique messenger
BSA	= albumine de sérum bovin (bovin serum albumin)
CD23	= récepteur de faible affinité des IgE
cDNA	= ADN complémentaire
Ci	= Curie
cpm	= coup par minute
CTP	= cytosine triphosphate
EC ₅₀	= concentration du composé qui produit 50% de son effet maximal (effective concentration)
EDTA	= acide éthylènediaminetétraacétique
G _i	= protéine G inhibitrice
5-HETE	= acide 5-hydroxyeicosatétraénoïque
5-HPETE	= acide 5-hydropéroxyeicosatétraénoïque
IFN γ	= interféron gamma
Ig	= immunoglobuline
IL-1	= interleukine 1
IL-2	= interleukine 2
IL-2r α	= chaîne α du récepteur de l'interleukine 2
IL-2r β	= chaîne β du récepteur de l'interleukine 2
IL-2r γ	= chaîne γ du récepteur de l'interleukine 2
IL-2r	= interleukine 2 recombinante
IL-4	= interleukine 4
IL-4r	= interleukine 4 recombinante
IL-6	= interleukine 6

Kb	= kilobase
KD	= kilodalton
K _d	= constante de dissociation
LTA ₄	= leucotriène A ₄
LTB ₄	= leucotriène B ₄
LTC ₄	= leucotriène C ₄
LTD ₄	= leucotriène D ₄
LTE ₄	= leucotriène E ₄
MK866	= acide 3-[1-(4-chlorobenzyl)-3-t-butyl-thio-5-isopropylindol-2-yl]-2,2-dimethylpropanoïque
NK	= tueuse naturelle (natural killer)
PAF	= facteur activateur des plaquettes (platelet-activating factor)
PBML	= leucocytes mononucléaires du sang périphérique (peripheral blood mononuclear leukocyte)
PBS	= tampon phosphate salin (phosphate buffered saline)
PHA	= phytohémagglutinine
PLA ₂	= phospholipase A ₂
SDS	= sodium dodécyl sulfate
TNF	= facteur de nécrose des tumeurs (tumor necrosis factor)
U.V.	= ultra violet

INTRODUCTION

1.1 SYSTEME IMMUNITAIRE

Le système immunitaire est responsable de la défense du corps contre les envahisseurs étrangers incluant les organismes pathogènes, les cellules tumorales et les cellules allogéniques (cellules de tissus transplantés provenant d'un donneur génétiquement différent). Ce système de défense est armé de plusieurs types cellulaires possédant plusieurs fonctions. C'est au niveau de la moëlle osseuse qu'originent toutes les cellules composant le système immunitaire. A partir de cellules souches pluripotentes, il y a naissance de deux lignées cellulaires distinctes, l'une myéloïde, l'autre lymphoïde. Selon le microenvironnement dans lequel il se localise, l'ancêtre lymphoïde se différencie soit en cellules T (dans le thymus), soit en cellules B (dans le foie foetal et la moëlle osseuse). Le progéniteur myéloïde, quant à lui, se différencie en plusieurs types cellulaires dont les globules rouges, plaquettes, neutrophiles, basophiles, éosinophiles ou monocytes. L'origine des lymphocytes qui ne sont ni T, ni B (cellules nulles) est encore incertaine. Elles peuvent avoir une origine lymphoïde ou myéloïde, mais aussi provenir d'une lignée distincte. (Abbas et coll., 1991)

Il existe une communication active entre les diverses cellules, et aussi entre elles et les cellules parenchymateuses. La communication est très importante pour l'obtention d'une réponse immunitaire efficace. Ces interactions se font, entre autre, via des cytokines (IL-2, IL-4 etc...) et des médiateurs lipidiques (PAF, LTB₄ etc...). Ceux-ci font l'objet de plusieurs études; on essaie dans notre laboratoire de mieux comprendre leur fonction, leur régulation, leur mécanisme d'action et aussi leur site de liaison (récepteur).

1.2 MONOCYTES

Les éléments figurés du sang sont composés, entre autre, de cellules phagocytaires mononucléées originant de l'ancêtre myéloïde. Ce sont les monocytes, importants dans la réponse immunitaire spécifique et non-spécifique. Leur fonction de cellules présentatrices d'antigène en fait un élément indispensable dans la réponse immunitaire spécifique, tandis que leur fonction de phagocytose est impliquée dans la réponse non-spécifique (Abbas et coll., 1991).

Lorsque stimulés, les monocytes produisent diverses cytokines dont IL-1 et IL-6 qui sont responsables de plusieurs activités biologiques (Bauer et coll., 1988; Tosato et coll., 1988), et le TNF α qui est important dans leur activité cytotoxique et proinflammatoire (Le et Vilcek, 1987; Beutler et Cerami, 1987). Il y a également sécrétion du PAF, médiateur lipidique, qui joue un rôle très important dans l'immunorégulation et dans les réponses proinflammatoires. (Camussi et coll., 1983; Braquet et Rola-Pleszczynski, 1987a)

A l'aide de leur marqueurs de surface (phénotype), de leur morphologie et de leurs activités enzymatiques, on peut identifier les monocytes parmi les autres types cellulaires.

Le phénotype, qui permet d'identifier la lignée cellulaire ou le stade de différenciation, est désigné dans la nomenclature internationale par CD (Cluster of differentiation) suivi par un chiffre. La molécule CD14 sert de marqueur de surface spécifique au monocyte. Récemment il a été démontré que le CD14 serait le récepteur du complexe de l'endotoxine bactérienne, le lipopolysaccharide (LPS), et de sa molécule de liaison, LPS-binding Protein (LBP) (Wright et coll., 1990)

Il existe plusieurs autres antigènes de surface qui sont exprimés de façon constitutive ou induite. La modulation d'expression de ces derniers est dépendante des interactions avec les autres cellules. Par exemple les lymphocytes T sécrètent différentes cytokines qui vont activer les monocytes via un récepteur spécifique. L'IL-4 est connu pour moduler plusieurs antigènes de surface des monocytes dont, entre autre, l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (De Velde et coll., 1988) et l'expression du récepteur de faible affinité du fragment Fc des IgE (FcεRII/CD23) (Vercelli et coll., 1988). D'autre part l'interféron gamma (IFNγ) possède également un pouvoir modulateur sur plusieurs molécules de surface des monocytes. On le compare souvent à l'IL-4 car il possède des effets opposés à celui-ci (Becker et coll., 1990). Chez les monocytes au repos, la chaîne β du

récepteur de IL-2 (IL2R β) est exprimée de façon constitutive. (Ohashi et coll., 1989; Espinoza-Delgado et coll., 1990), tandis que la chaîne α du récepteur de IL-2 (IL2R α) est induite entre autre, par IFN γ . (Herrmann et coll., 1985). D'autres agents peuvent aussi moduler, de façon positive ou négative, l'expression des marqueurs de surface, dépendant du microenvironnement de la cellule.

1.3 LYMPHOCYTES

Le progéniteur lymphoïde engendre une lignée cellulaire qui est très importante dans la réponse immunitaire spécifique. Cette lignée est appelée les lymphocytes, qui eux, se subdivisent en sous-populations distinctes. Même s'ils apparaissent tous semblables morphologiquement, ils possèdent des fonctions distinctes et des phénotypes différents. D'une part, on retrouve les lymphocytes B: ils se caractérisent par la production d'anticorps spécifiques contre des antigènes (plasmocytes). On retrouve à leur surface des immunoglobulines comme récepteur de l'antigène et de plus, la molécule CD19 qui est un marqueur spécifique des lymphocytes B. On croit que le CD19 joue un rôle dans l'activation ou dans la régulation des lymphocytes B (Abbas et coll., 1991).

D'autre part, on retrouve la grande famille des lymphocytes T. Ces lymphocytes participent également dans la réponse immunitaire spécifique par l'intermédiaire de la reconnaissance de l'antigène par le récepteur des lymphocytes T (TCR). Ce récepteur est associé à un complexe invariant appelé CD3. Ce complexe est composé de 5 chaînes peptidiques dont α , δ , ϵ , ζ et η (Abbas et coll., 1991). Ainsi, tous les lymphocytes T sont CD3⁺. On distingue 3 grandes sous-populations de lymphocytes T selon leur fonctions.

Premièrement, les lymphocytes T "helper" (Th) qui sont $CD3^+$ $CD4^+$ $CD8^-$, les lymphocytes T "suppresseurs" (Ts) qui sont $CD3^+$ $CD4^-$ $CD8^+$ et les lymphocytes T cytotoxiques (Tc) qui sont également $CD3^+$ $CD4^-$ $CD8^+$. Les lymphocytes T lorsqu'activés par un antigène ou par un mitogène, produisent diverses cytokines dont l'IL-2 qui permet l'expansion clonale des lymphocytes, (Farrar et coll., 1978; Shaw et coll., 1978).

1.4 Grands lymphocytes granuleux (LGLs)

Dans le sang périphérique, on retrouve également d'autres lymphocytes qui eux, n'expriment ni les marqueurs de surface des lymphocytes T, ni ceux des lymphocytes B. Ces cellules sont de grands lymphocytes qui possèdent plusieurs granules cytoplasmiques et sont capables de lyser une variété de cellules cibles. C'est ainsi que ces lymphocytes sont appelés "grands lymphocytes granuleux" (LGLs). Les LGLs possèdent une activité cytotoxique appelée "natural killer" (NK) ou cytotoxicité naturelle. Contrairement aux lymphocytes T cytotoxiques (Tc) leur activité cytotoxique n'est pas restreinte par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité et l'activité NK est dite naturelle, sans sensibilisation antigénique au préalable. Cette cytotoxicité s'observe "*in vitro*" contre certaines cellules tumorales (Takasugi et coll., 1973), des cellules normales (Timonen et coll., 1979) et des cellules infectées par un virus (Fitzgerald et coll., 1983). Plusieurs auteurs croient que les cellules à activité NK, grâce à certaines de leurs propriétés, joueraient un rôle important dans la protection de l'hôte contre des cellules tumorales et des infections ainsi que dans l'immunorégulation (Herberman et Ortaldo, 1981; Haliotis et coll., 1985; Lotzova et Heberman, 1986).

Des études ont démontré que les interférons (Timonen et al., 1982; Abbud-Fiho et coll., 1986; Van de Griend et coll., 1986), l'IL-2 (Henney et coll., 1981; Sayers et coll., 1986), l'IL-1 (Dempsey et coll., 1982; Bloom et coll., 1986) le $TNF\alpha$ (Ostenson et coll., 1987), l'IL-6 (Luger et coll., 1989) et le LTB_4 (Rola-Pleszczynski et coll., 1983) sont des agents pouvant exercer une modulation positive sur l'activité NK des LGLs. L'IL-4 par contre agit comme un agent inhibiteur de l'activité NK (Vitté-Mony et coll., 1990). Egalement les anticorps anti-IL2R β (TU27) inhibent l'augmentation de l'activité NK par IL-2 (Umehara et Bloom, 1990).

La cytotoxicité NK peut se mesurer à l'aide d'essais à court terme (4h) (Trinchieri et Perussia, 1984). Les cellules cibles de ce type de cytotoxicité chez l'homme incluent des cellules dérivés d'une leucémie humaine (K562).

Dans le sang humain, la sous population des lymphocytes possédant l'activité NK, peut être identifiée à l'aide de ses marqueurs de surface. Les lymphocytes possèdent à leur surface le CD56 (molécule d'adhésion retrouvée seulement chez les NK), le CD2 (récepteur des globules rouges de mouton) et le CD16 (récepteur de faible affinité de la portion Fc des IgG). Ils n'expriment pas à leur surface le CD3 (molécules associées au récepteur des lymphocytes T).

1.5 Interleukine 2

IL-2, originalement appelée facteur de croissance des lymphocytes T, est une glycoprotéine de 17 kD importante dans la cascade des lymphokines secrétées durant la réponse immunitaire (Farrar et coll., 1982). Lorsque les lymphocytes T sont activés, il y a sécrétion de IL-2, qui agit de façon autocrine pour ainsi engendrer la prolifération et la différenciation des lymphocytes T (Meuer et coll., 1984). Elle stimule également la prolifération et la maturation d'autres types cellulaires. De plus, IL-2 augmente la cytotoxicité chez les cellules NK (Henney et coll., 1981) et les monocytes (Malkovsky et coll., 1987). On sait qu'elle augmente la synthèse d'immunoglobulines chez les lymphocytes B. Les actions directes et indirectes de IL-2 sont nombreuses et très diversifiées.

Au début des années 80, le groupe de Kendall A. Smith a mis en évidence un récepteur spécifique pour IL-2 (Smith, 1980). Il est constitué de deux chaînes peptidiques qui possèdent chacune un site de liaison pour IL-2. Les sous-unités sont différentes (hétérodimère) et leur association n'est pas de nature covalente (Tsuda et coll., 1986; Sharon et coll., 1986; Teshigawara et coll., 1987). Lorsque les sous-unités sont associées, le récepteur est dit de "haute affinité" ($K_d=1 \times 10^{-12} M$).

La chaîne α a été la première à être caractérisée par des études de liaison croisées avec de IL-2 marqué radioactivement (Robb et coll., 1981) et par un anticorps monoclonal (anti-Tac) (Uchiyama et coll., 1981). C'est un polypeptide de 55 KD (p55) communément appelé "Tac" (T activation) ou CD25.

Cette chaîne possède trois domaines dont un de 219 acides aminés qui est extracellulaire, un domaine intramembranaire de 19 acides aminés et un court domaine intracellulaire de 13 acides aminés. (Leonard et coll., 1984; Cosman et coll., 1984; Nikaido et coll., 1984). Ces 13 acides aminés intracytoplasmiques ne permettent pas la transduction d'aucun message et ne peuvent internaliser l'IL-2 (Sabe et coll., 1984; Greene et coll., 1985). De plus l'IL-2 se lie à la p55 avec une faible affinité ($K_d=1 \times 10^{-8} M$). (Tsuda et coll., 1986; Teshigawara et coll., 1987; Robb et coll., 1987). Il a été démontré, chez des lymphocytes activés, que la chaîne α , relâchée sous forme soluble, peut lier IL-2 et ainsi être compétitive au récepteur membranaire. (Rubin et coll., 1985; Robb et coll., 1987; Honda et coll., 1990).

A l'aide d'autres études de liaisons croisées, de mutagenèse et de transfection, on a découvert et caractérisé la chaîne β (Sharon et coll., 1986). Celle-ci est un polypeptide de 75 KD (p 75, IL-2RB), composé de trois

domaines. Contrairement à la chaîne α , le domaine intracellulaire est beaucoup plus grand (286 a.a)(Hatakeyama et coll., 1989). IL-2 se lie à la p75 avec une affinité intermédiaire ($K_d=1 \times 10^{-9} M$). Le cDNA du IL2R β a été isolé (Hatakeyama et coll., 1989) et a permis de démontrer que IL2R β jouait un rôle essentiel dans l'internalisation du IL-2 et la transduction du message (Tsuda et coll., 1990). A l'aide de différents mutants de délétion du cDNA de IL2R β , Hatakeyama et coll.(1989) ont démontré que les acides aminés se trouvant sous la région transmembranaire, étaient critiques pour la transduction du message. Un anticorps spécifique, anti-phosphotyrosine, a permis de démontrer que l'interaction de IL-2 avec son récepteur de haute affinité induisait la phosphorylation de tyrosine sur des protéines de 92,80,78,70-75 et 57 KD, (Mills et coll., 1990). Celle de 78 Kd représente l'IL2R β phosphorylé. Le cDNA de IL2R β montre dans le domaine intracytoplasmique six résidus tyrosine et un motif de trois acides aminés (Ala-Pro-Glu) semblable à un domaine catalytique de protéine kinase incluant les tyrosines kinases (Asao et coll., 1990; Mills et coll., 1990). On soupçonne que le IL2R β devient phosphorylé pour être activé et transmettre un signal à la cellule (Asao et coll., 1990). La nature des autres protéines phosphorylées n'est pas encore très bien établies (Mills et coll., 1990). Ainsi, IL-2 va se lier premièrement sur IL2R β qui transmet un signal dans la cellule pour induire la synthèse de IL2R α . Celui-ci va s'associer à

IL2R β pour former un récepteur de haute affinité (Teshigawara et coll., 1987) et ainsi obtenir une meilleure liaison de IL-2. L'IL2R α est donc important pour l'obtention du récepteur à haute affinité et également pour permettre la prolifération et la différenciation de la cellule.

Siegel et coll (1987), ont voulu voir le rôle que peuvent jouer les sous-unités α et β . Tout d'abord, ils ont isolé des LGLs exprimant au repos seulement IL2R β mais non IL2R α et les ont stimulés avec de l'IL-2. Ils ont observé une augmentation de l'activité NK, une activité LAK et une réponse proliférative. Par la suite, ils ont étudié en présence d'un anti-Tac (anti-IL2R α), le rôle que pourrait jouer la chaîne α chez les LGLs. Ils ont obtenu une inhibition de la réponse proliférative, une diminution significative de l'activité LAK et aucun effet sur l'activité NK. Ceci montre que le récepteur de haute affinité contenant IL2R α est indispensable dans la phase tardive pour la génération de l'activité LAK et la réponse proliférative et non dans la phase précoce. Plus tard avec la découverte d'un anti-IL2R β (TU27) (Takeshita et coll., 1989), il a été démontré que IL2R β est directement responsable de l'activation des cellules NK par IL-2. (Phillips et coll., 1989)

L'IL2R β est exprimé préférentiellement sur les LGLs au repos et surtout la sous-population CD56⁺(NK). Chez les lymphocytes T CD4⁺ et les lymphocytes B, l'expression du IL2R β est presque nulle. Par contre sur les lymphocytes T CD8⁺ et les monocytes, on retrouve IL2R β exprimé de façon constitutive mais de façon moins élevée que chez les CD56⁺. (Ohashi et coll., 1989). Molkovsky et coll. (1986) ont observé que IL-2 augmentait la cytotoxicité des monocytes. A l'aide de l'anti-IL2R β , il a été démontré que IL2R β était responsable de cette activation de IL-2 chez les monocytes (Espinoza-Delgado et coll., 1990).

Les effets de la phytohémagglutinine (PHA) et IL-4 sur l'expression de IL2R sont bien connus. La PHA augmente l'expression des 2 chaînes du récepteur de IL-2 tandis que IL-4 diminue celles-ci. (Martinez et coll., 1990)

Le groupe de Waldmann et de Sharon a proposé un modèle structural différent pour le récepteur de IL-2 (Fig.1)(Waldmann, 1991). C'est un modèle multichaine qui permet de mieux répondre à toutes les interrogations non-résolues avec l'ancien modèle. Par exemple, on observe des protéines qui coprécipitent avec les deux chaînes lors de diverses analyses. De plus si on transfecte le cDNA du IL2R β dans une lignée de fibroblastes (lignée non-lymphoïde), l'affinité pour IL-2 n'est pas intermédiaire mais plus basse ou inexistante. (Hatakeyama et coll., 1989; Tsudo et coll.,

1990) Dans le modèle proposé, ce ne sont que les sous-unités α et β qui lient l'IL-2, comme dans l'ancien modèle sauf qu'au voisinage de ces deux sous-unités, on soupçonne d'autres polypeptides venant interagir avec l'hétérodimère.

Le groupe de Takeshita vient d'identifier une molécule qui coprécipite avec IL2R β lors d'immunoprécipitation avec l'anticorps monoclonal TU11 (spécifique à IL2R β) (Takeshita et coll., 1992a). Cette molécule est appelée p64 et puis chaîne γ du récepteur de IL-2 (IL2R γ). Récemment, le même groupe a cloné le cDNA de IL2R γ . (Takeshita et coll., 1992b). La chaîne γ serait associée à la chaîne β pour ainsi former un complexe qui lie IL-2 avec une meilleure affinité que IL2R β seule. De plus cette association IL2R $\beta\gamma$ serait importante pour que IL2R β soit fonctionnelle.

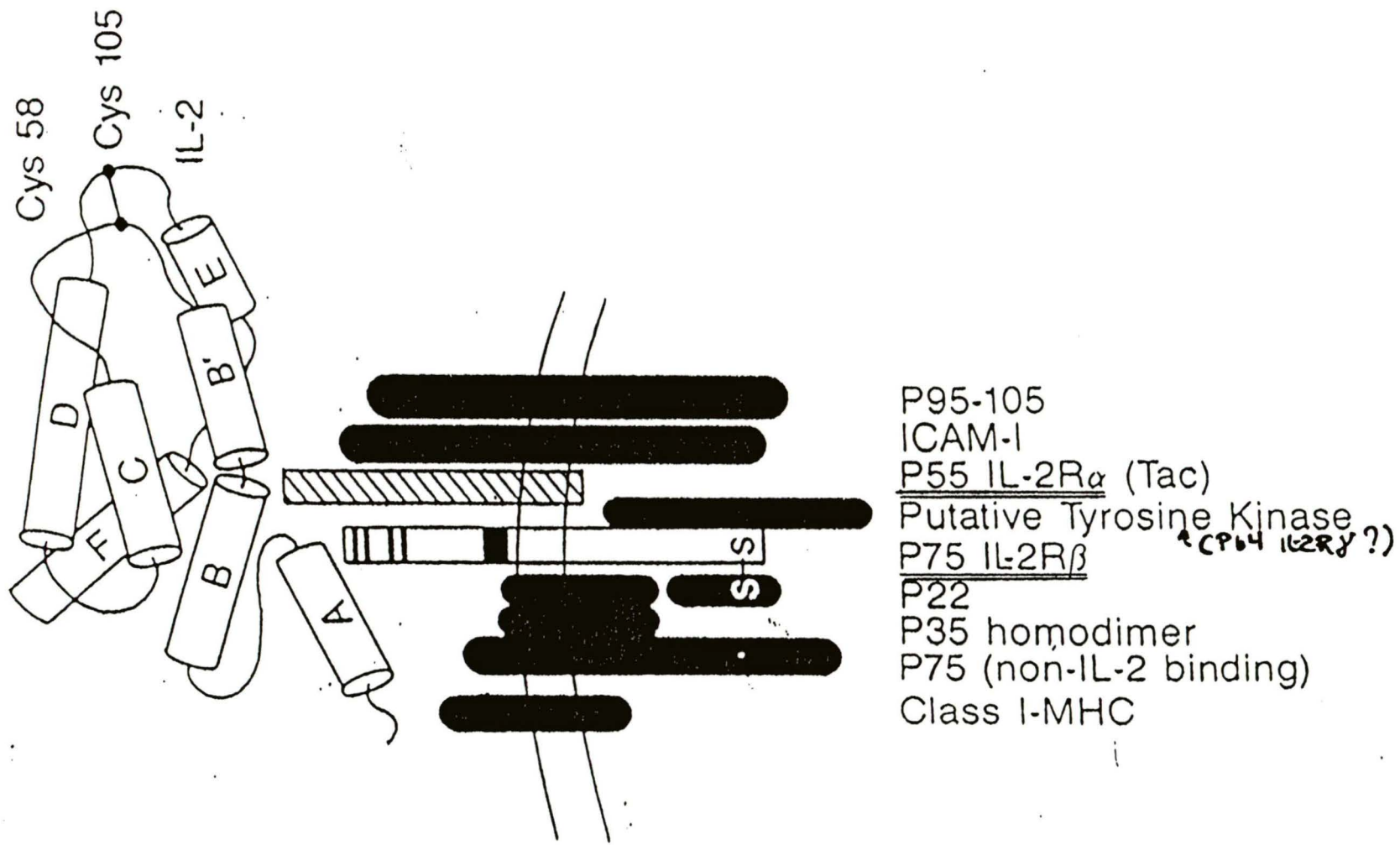


Fig.1 Récepteur de l'IL-2 (Waldmann , 1991)

1.6 LEUCOTRIENE B₄

Les leucotriènes sont des métabolites de l'acide arachidonique, jouant un rôle de médiateurs dans la réaction inflammatoire et dans de nombreux autres phénomènes cellulaires. Ce n'est qu'en 1979 que leur structure a été élucidée par le groupe de Samuelsson. Les leucotriènes ont été découverts lors d'études sur le métabolisme de l'acide arachidonique chez les neutrophiles de lapin (Borgeat et Samuelsson, 1979a; Samuelsson et coll., 1979)

L'acide arachidonique est un constituant majeur des lipides membranaires. On le retrouve sous forme d'ester (phospholipides, glycérides et esters de cholestérol). A la suite de perturbations membranaires et de l'activation de la PLA₂, l'acide arachidonique est relâché des phospholipides membranaires et métabolisé par la voie de la cyclooxygénase ou de la lipoxygénase. Les leucotriènes originent de l'action de la 5-lipoxygénase sur la double liaison en C-5 de l'acide gras. La découverte d'une nouvelle classe d'inhibiteur des leucotriènes de type indol (MK866) (Rouzer et coll., 1990) a démontrée que la 5-lipoxygénase venait s'associer à une protéine membranaire de 18KD pour être activée. Cette protéine a été appelé FLAP (five lipoxygenase activating protein)(Miller et coll., 1990). Par la suite il y a premièrement formation d'un intermédiaire, le 5-HPETE (Samuelsson et coll., 1987). Ce dernier est rapidement

transformé en leucotriène A_4 qui est le précurseur commun des leucotriènes. Le LTB_4 qui est le produit de l'action d'une hydrolase sur le LTA_4 est une molécule lipidique stable qui peut être rapidement dégradé par les leucocytes polymorphonucléaires en métabolites inactifs, $20-OH-LTB_4$ et $20-COOH-LTB_4$ (Borgeat et coll., 1985). D'autre part LTA_4 peut se transformer en LTC_4 , LTD_4 ou LTE_4 sous l'action successive de peptidases.

Le LTB_4 est rapidement synthétisé par les cellules phagocytaires, principalement les neutrophiles (Borgeat et Samuelsson, 1979b) et les macrophages alvéolaires (Fels et coll., 1982) suivant une activation par différents stimuli particuliers et inflammatoires. Sa synthèse peut aussi être induite par le PAF-acéther (Chilton et coll., 1982).

Le LTB_4 a été décrit premièrement comme un puissant agent proinflammatoire. Depuis quelques années, le groupe de Rola-Pleszczynski a mis en évidence le potentiel d'immunorégulation très important des leucotriènes, et en particulier du LTB_4 . D'après leurs travaux, ce médiateur lipidique exercerait des fonctions régulatrices sur une variété de cellules lymphocytaires et autres populations. Il peut en effet induire des cellules suppressives, activer la synthèse et la production, chez les lymphocytes T "helper", de certaines lymphokines, dont l'IL-2 et l'IFN γ (Rola-Pleszczynski et coll., 1986). De plus il stimule la

production d'IL-1 chez les monocytes humains (Rola-Pleszczynski et Lemaire, 1985), et active plusieurs types de leucocytes cytotoxiques contre des cellules-cibles tumorales ou infectés par des virus. (Rola-Pleszczynski et coll., 1983)

. Ainsi plusieurs travaux suggèrent que le LTB₄ jouerait un rôle important dans les interactions entre les phénomènes inflammatoires et immunologiques.

1.7 PAF

Le PAF est un médiateur lipidique de petit poids moléculaire découvert en 1972 par Benveniste et coll (Benveniste et coll; 1972). Ceux-ci avaient démontré que les basophiles sensibilisés à un antigène relâchaient un médiateur ayant le potentiel d'agréger "in vitro" les plaquettes de lapin. En 1979, la structure chimique du PAF a été identifiée comme un AGEPC (1-O-alkyl-2-acétyl-sn-glycéro-3-phosphorylcholine)(Demopoulos et coll., 1979; Benveniste et coll., 1979).

A la suite d'une stimulation appropriée, il y a augmentation du calcium intracellulaire, lequel active la PLA2. Celle-ci lorsqu'activée métabolise des phospholipides membranaires en lysophosphatidylcholine (lysoPAF) et en acide gras qui est souvent l'acide arachidonique. Cet acide gras est le précurseur des prostaglandines et des leucotriènes. D'autre part, sous l'action d'une acétyltransférase, le lysoPAF devient le PAF. La biosynthèse du PAF nécessite l'action séquentielle de deux enzymes dépendentes de calcium (Braquet et coll., 1987a). Ces deux enzymes sont localisés dans la membrane tandis que dans le cytosol, il existe une acétylhydrolase qui transforme le PAF en lysoPAF(Braquet et coll., 1987a). Le PAF, contrairement à l'histamine, n'est pas préformé mais est relâché dans le milieu sous forme d'un médiateur nouvellement synthétisé.

Celui-ci est très hydrophobe et rapidement dégradé par des enzymes présentes dans le plasma. Sa demie vie dans le sang est environ 30 secondes. (Blank et coll., 1981; Lartigue-Mattei et coll., 1984)

Le PAF est reconnu pour ses propriétés inflammatoires et immunorégulatrices. Il est produit et active une variété de cellules impliquées dans ces réactions, incluant les plaquettes (Chignard et coll., 1981), neutrophiles (Lynch et coll., 1979), éosinophiles (Lee et coll., 1982), cellules endothéliales (Camussi et coll., 1983) et monocytes/macrophages (Camussi et coll., 1983; Albert et coll., 1983). En plus de son potentiel d'agréger des plaquettes, le PAF peut, entre autre, promouvoir la dégranulation et la chimiotaxie des neutrophiles et des éosinophiles et la contraction des muscles lisses (Braquet et coll., 1987b). Chez les macrophages, le PAF peut stimuler ou induire l'agrégation (Yasaka et coll., 1982), la chimiotaxie (Hartung., 1983), la production d'IL-1 (Pignol et coll., 1987), la production de TNF (Dubois et coll., 1989) et l'expression d'oncogènes (Ho et coll., 1987). Il a été démontré également que le PAF influence les fonctions lymphocytaires. Par exemple, l'inhibition de la prolifération des lymphocytes humains, de la production d'IL-2 et l'induction de l'activité suppressive des lymphocytes T (CD8⁺) (Rola-Pleszczynski et coll., 1987, 1988).

Le PAF agit sur les cellules via un récepteur spécifique de haute affinité qui a été retrouvé chez les plaquettes humaines et celles du lapin (Valone et coll., 1982; Hwang et coll., 1988), les neutrophiles humains, les macrophages murins (Valone, 1988), le tissu pulmonaire (Hwang et coll., 1985) et sur plusieurs lignées myéloïdes dont les cellules U937 (lignée promyélocytaire) (Lee et coll., 1990). Les effets du PAF sont stéréospécifiques et peuvent être bloqués par différents antagonistes (Heymans et coll., 1981; Braquet et coll., 1987b). Ceux-ci sont des outils importants pour l'élucidation des activités biologiques du PAF ainsi que la détection de récepteurs.

Lorsque la PAF se lie au récepteur, il y a activation d'une protéine G_i (Houslay et coll., 1986; Hwang et coll., 1986) qui inhibe l'adénylate cyclase, stimule l'ouverture des canaux calciques et active des phospholipases. Ces dernières produisent du diacyl glycérol (DAG), l'inositol triphosphate (IP_3) et l'acide arachidonique et ses dérivés. Tout ceci amène donc une augmentation de Ca^{++} intracellulaire, l'activation de la protéine kinase C (PKC) et la phosphorylation de protéines cellulaires responsables de la réponse médiée par le PAF. (Kishimoto et coll., 1980; Ieyasu et coll., 1982; Lapetina et coll., 1982).

Plusieurs effets du PAF sur les cellules, tissus ou organes sont attribués non seulement au PAF lui-même, mais aussi à certains produits du métabolisme de l'acide arachidonique relâché en réponse au PAF (Peplow et Mikhailidis, 1990). Ces produits obtenus de la voie de la cyclooxygénase et de la lipoxygénase peuvent se combiner à l'action du PAF pour moduler la stimulation ou peuvent s'opposer aux effets de celui-ci. Chez les neutrophiles, le PAF provoque la dégranulation; celle-ci peut être amplifiée de 100 à 1000 fois en présence de 5-HETE. Lorsqu'il est seul, le 5-HETE ne provoque aucun effet (O'Flaherty et coll., 1983).

Dernièrement, le cDNA du récepteur du PAF des leucocytes humains a été cloné (Nakamura et coll., 1991). Ce clone sera entre autre un bon outil pour l'analyse de l'interaction du PAF avec son récepteur, et aussi pour le développement de substances thérapeutiques pour les maladies allergiques et inflammatoires.

1.8 RECEPTEUR DE FAIBLE AFFINITE DES IgE

Il existe deux types de récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines E(IgE), appelés FcεRI et FcεRII ou CD23. Le FcεRI est exprimé sur les basophiles et les mastocytes. Il lie les IgE avec une forte affinité ($1 \times 10^{-10} \text{M}$) (Metzger et coll., 1988). Le FcεRII ou CD23 est retrouvé sur une variétés de cellules hématopoïétiques et son affinité pour les IgE est faible ($1 \times 10^{-7} \text{M}$) (Spiegelberg, 1984). Les récepteurs de haute et de faible affinité pour les IgE ont une antigénicité distincte, une structure différente et ils sont encodés par des gènes distincts. Durant les dernières années, il y a eu un progrès significatif dans la compréhension de la structure et la biologie du CD23. Ceci a été possible grâce à la mise au point d'un anticorps spécifique contre le CD23 et au clonage du cDNA du CD23. (Kikutani et coll., 1986a; Lüdin C. et coll., 1987) .

Le CD23 est une protéine membranaire possédant une seule chaîne peptidique de 321 acides aminés. On observe un domaine intracytoplasmique de 23 acides aminés, un domaine transmembranaire de 21 acides aminés. et un long domaine extracellulaire de 277 acides aminés. qui peut être clivé et ainsi devenir soluble. On retrouve le CD23 sur les lymphocytes, les monocytes-macrophages (Melewicz et coll., 1982a;1982b) les éosinophiles (Capron et coll., 1981), les

plaquettes (Joseph et coll., 1983) et la lignée cellulaire humaine promyélocytaire, U937 (Anderson et Spiegelberg, 1981).

La majorité des cellules CD23⁺ dans le sang humain sont des lymphocytes B (Delespesse et coll., 1986) et il apparaît être un marqueur de différenciation de ceux-ci (Kikutani et coll., 1986b; Waldschmidt et coll., 1988). L'expression du CD23 chez les cellules B est modulé par des lymphokines dérivées des lymphocytes T (IL-4 et IFN γ). L'IL-4 induit l'expression du CD23 et l'IFN γ supprime l'induction de CD23 par l'IL-4 (Defrance et coll., 1987; Pène et coll., 1988). Chez les monocytes humains, l'IL-4 accroît aussi le CD23 et cet effet n'est pas inhibé par l'IFN γ (Vercelli et coll., 1988). Celui-ci augmente même le CD23 dans des lignées myélocytaires.

Le rôle du Fc ϵ RII sur les macrophages et les monocytes a été premièrement décrit par Capron et coll.(1975) qui démontraient que le CD23 médiait la cytotoxicité IgE-dépendante contre certains parasites. Le même groupe a démontré la même fonction du CD23 chez les éosinophiles (Capron et coll., 1981) et les plaquettes (Joseph et coll., 1983). Il a été aussi démontré que le CD23 favorise la phagocytose des particules enrobés d'IgE (Melewick et coll., 1981), et aussi le relâchement de plusieurs médiateurs lipidiques incluant les leucotriènes (Spiegelberg et coll.,

1986; Rankin et coll., 1986). Le tableau 1 résume les diverses fonctions proposés du CD23 pour diverses cellules du système immunitaire.

TABLEAU 1

EXPRESSION ET FONCTIONS DU CD23 MEMBRANAIRE DANS DIVERS TYPES CELLULAIRES

Cellules	Fonctions proposées
Lymphocytes B (1)	Présentation de l'antigène aux cellules T via les IgE spécifiques Régulation de synthèse d'IgE Récepteur de facteur de croissance ? sCD23 facteur de croissance autocrine?
Lymphocytes T(1)	Contrôle de la prolifération
Monocytes/macrophages U937 (2,3,4)	Cytotoxicité de type ADCC Défense antiparasitaire. Phagocytose Libération de médiateurs de l'inflammation
Eosinophiles hypodenses (5)	Cytotoxicité de type ADCC Défense antiparasitaire
Plaquettes (6)	Cytotoxicité de type ADCC Défense antiparasitaire

1- Yodoi et coll.,1979

2- Melewicz et coll.,1982a

3- Melewicz et coll .,1982b

4- Anderson et Spielgelberg,1981

5- Capron et coll.,1981

6- Joseph et coll.,1983

1.9 BUT DU PROJET

Il y a quelques années, le groupe de Rola-Pleszczynski a mis en évidence différents effets du LTB_4 sur le mécanisme de cytotoxicité des lymphocytes. Ils ont démontré que LTB_4 augmentait l'activité cytotoxique des lymphocytes NK, en stimulant la liaison des cellules effectrices avec leurs cellules cibles et en augmentant le pouvoir lytique des cellules effectrices.

On sait que l'IL-2 peut également augmenter l'activité cytotoxique des lymphocytes NK et que la chaîne β du récepteur d'IL-2 ($\text{IL2R}\beta$) est reconnue comme étant responsable de cette augmentation. Chez les lymphocytes CD56^+ , même au repos, l' $\text{IL2R}\beta$ est exprimé de façon constitutive.

A partir des résultats précédents, nous avons voulu vérifier si:

- 1o le LTB_4 avait un effet sur l'activité cytotoxique des lymphocytes humains médiée par l'IL-2
- 2o le LTB_4 avait un pouvoir modulateur sur l'expression du $\text{IL2R}\beta$ à la surface des lymphocytes humains
- 3o le LTB_4 avait un effet modulateur sur l'ARNm du $\text{IL2R}\beta$ chez les lymphocytes humains

Nous avons voulu vérifier également l'effet modulateur du LTB₄ sur l'expression du IL2R β chez les monocytes, car comme chez les lymphocytes, le LTB₄ et l'IL-2 augmentent l'activité cytotoxique des monocytes. Au repos, les monocytes expriment IL2R β de façon constitutive, mais à un niveau moins élevé que les cellules NK CD56⁺.

En plus d'étudier les effets du LTB₄ sur IL2R β chez les monocytes, nous avons également voulu étudier la modulation par LTB₄ de l'expression du récepteur de faible affinité des IgE, le CD23. Nous avons fait cette dernière étude dans le but de déterminer si un médiateur lipidique important dans les réactions allergiques pouvait moduler l'expression du CD23 comme peuvent le faire des cytokines, tels l'IL-4 et l'IFN γ .

Dans cette dernière étude, on a comparé l'effet du LTB₄ avec celui d'un autre médiateur lipidique important dans les allergies ,le PAF.

MATERIEL ET METHODES

2.1 MILIEU DE CULTURE

Le RPMI 1640 (Gibco, Burlington, Ont) est le milieu de culture utilisé dans ces études. Lors de sa préparation, on lui ajoute 80µg/ml de gentamicine (Schering Canada Inc, Pointe Claire, Québec) et 5% de serum de veau fœtal (FBS: Flow, McLean, VA). Le milieu DMEM (Flow) est utilisé pour la culture des cellules BHK (voir 2.3.3) seulement. A ce milieu sont ajoutés 80µg/ml de gentamicine et 5% de serum de veau (Flow).

2.2 REACTIFS

2.2.1 Lipides bioactifs

Le LTB₄ est fourni par le Dr A.W. Ford-Hutchinson des laboratoires Merck-Frosst, Dorval, Canada. Ce réactif est dissout dans l'éthanol et dilué à la concentration requise dans le milieu RPMI 1640. Le PAF (Bachem, PA) est dissout dans l'éthanol et dilué à la concentration voulue dans du milieu RPMI 1640 contenant 2.5mg/ml de BSA (Sigma Chemical Co., St-Louis, MO). La concentration finale d'éthanol, toujours inférieure à 0.03%, n'a pas d'effet sur les paramètres étudiés. Les témoins contiennent le milieu et le véhicule seulement.

2.2.2 Anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux utilisés pour la cytofluorométrie sont tous dirigés contre des antigènes cellulaires humains. Provenant de chez Becton Dickinson (San Jose, CA), l'anti Leu-20 (CD23), l'anti-Leu 19 (CD56), anti-CD8 et anti-CD4, sont utilisés à des concentrations de $0.1\mu\text{g}/10^6$ de cellules. L'anti-IL2RB (p75; Genzyme, Boston, MA) est employé à $1\mu\text{g}/10^6$ de cellules. Lors d'un marquage des cellules avec un seul anticorps monoclonal, on révèle celui-ci à l'aide d'un second anticorps (anti-Ig de souris) couplé à de la fluorescéine (FITC) (Jackson Immuno Research Laboratories Inc, West Grove, PA). On l'utilise à $0.25\mu\text{g}/10^6$ de cellules. Lors d'un marquage des cellules avec deux anticorps monoclonaux différents (marquage double), l'un des deux anticorps monoclonaux utilisé est conjugué au préalable à la phycoérythrine. (Becton Dickinson) (voir section cytofluorométrie).

2.2.3 Mitogène et cytokines recombinantes

La PHA (Difco, Detroit, MI) est diluée dans le RPMI 1640 de façon à obtenir une concentration finale de 0.1%. Elle est utilisée comme témoin positif pour l'induction de l'expression du récepteur IL2R β , tandis que IL-4r (Endogen, Boston, MA) est utilisée à une concentration finale de 100

U/ml comme témoin pour la suppression de l'expression de IL2RB. Dans les études sur l'expression du CD23, l'IFN γ r (Endogen) et IL-4r sont utilisés à plusieurs concentrations (0, 10, 50, 100, 200 U/ml) également. Dans l'essai de cytotoxicité des lymphocytes, on emploie également l'IL-2r (Endogen) en concentrations multiples (0, 0.1, 1, 10, 100 U/ml). Toutes ces cytokines sont diluées dans du RPMI 1640.

2.3 CULTURES CELLULAIRES

2.3.1 Cellules de la lignée U937

Les cellules U937 originent d'une leucémie myélocytaire humaine et sont utilisés dans l'étude de l'expression du CD23. Les cellules U937 sont cultivées dans des flacons de 75cm² (Falcon, Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ) dans du milieu RPMI 1640, supplémenté de 5% de FBS et maintenues à 37°C dans une atmosphère comprenant 95% d'air et 5% de CO₂. Ces cellules sont redistribuées à 0.5X10⁶cellules/ml de milieu, 2 fois par semaine. La veille d'une expérience, les cellules sont centrifugées, lavées et resuspendues à la concentration de 0.5X10⁶cellules/ml de milieu RPMI 1640 pour ainsi être en phase de croissance exponentielle le lendemain.

2.3.2 Cellules de la lignée K562

Les cellules K562 sont une lignée cellulaire humaine provenant d'une leucémie myéloïde chronique et ayant une morphologie semblable à celle des lymphoblastes. Les cellules K562 ont la particularité d'être sensibles à l'activité NK humaine (Ortaldo et coll., 1977). Elles sont donc utilisées comme cellules cibles dans les essais de cytotoxicité. Ces cellules sont cultivées à 37°C dans des flacons de 75cm² et maintenues dans une atmosphère de 5% CO₂ et 95% d'air. Etant des cellules en suspension, il suffit de les centrifuger lorsqu'elles atteignent la confluence, et de les resuspendre à 0.5×10^6 c/ml de milieu RPMI 1640 additionné de 5% FBS, ceci 2 fois par semaine. Avant d'être utilisées, les cellules K562 doivent être additionnées de milieu frais 24 h auparavant.

2.3.3 Cellules BHK

Les cellules BHK (Baby Hamster Kidney) sont des cellules adhérentes, servant à la production d'un microexudat de fibronectine. Cette dernière est utilisée pour séparer les monocytes par adhérence. Les BHK sont cultivés dans des flacons de 75cm², dans un milieu DMEM supplémenté de 5% de sérum de veau et 80µg/ml de gentamicine. Cette lignée est maintenue à 37°C dans une

atmosphère composée de 95% d'air et 5% de CO₂ de façon à lui permettre de sécréter de la fibronectine. Lorsque les cellules atteignent la confluence, elles sont détachées du flacon à l'aide d'une solution de trypsine-versène et diluées 1:10, 2 fois par semaine. Dans le cas où on veut obtenir la couche de fibronectine, les cellules sont détachées avec une solution de 0.01M de EDTA monosodique. On récupère les flacons en les rinçant 2 fois au PBS (0.25M KCl, 0.8M Na₂HPO₄, 0.15M KH₂PO₄, complété avec de la saline 0.9%) et on les conserve à -20°C jusqu'à utilisation.

2.4 TECHNIQUES EXPERIMENTALES

2.4.1 Séparation des leucocytes mononucléaires du sang périphérique (PBML)

Le sang périphérique humain prélevé sur des donneurs sains est distribué sur un gradient de Ficoll-Hypaque (Ficoll 400, Pharmacia, Uppsala, Sweden; Hypaque Sodium, Winthrop Laboratories, Aurora, Ont.) de densité 1.077 et centrifugé à la température ambiante pendant 30 min à 500 g. Les PBML sont recueillis à l'interface puis lavés dans du PBS 1 fois à 500 g durant 20 min pour enlever l'excédent de Ficoll et 2 autres fois à 350 g pendant 10 min. Après les lavages, les PBML sont resuspendus dans du milieu RPMI 1640, 5% FBS et comptés au microscope. Les cellules mononucléaires ainsi obtenues consistent en 80-95% de lymphocytes, 5-20 % de monocytes et <1% de neutrophiles.

Les PBML totaux sont traités avec divers stimuli pendant 24h ou 48h d'incubation et par la suite analysés par cytofluométrie. Ils peuvent être également séparés sur fibronectine pour l'obtention de lymphocytes purifiés, non adhérents, et de monocytes qui adhèrent à la fibronectine. Ainsi on obtient une population presque pure de lymphocytes. Ces derniers sont incubés à 37°C pendant différentes périodes de temps pour l'analyse de l'ARNm du IL2R β ou

incubés 24h pour effectuer une étude sur leur pouvoir cytotoxique contre les cellules K562.

2.4.2 Cytofluorométrie

Les PBML sont aliquotés à la concentration de 1×10^6 cellules/tube et incubés pendant 24h ou 48h avec différents stimuli à 37°C dans 5% de CO₂ et 95% d'air. Les tubes sont centrifugés pendant 5 min à 350 g puis les culots sont resuspendus dans du PBS et répéter les même étapes deux autres fois. Le culot ainsi obtenu est finalement resuspendu dans 50 μ l de milieu RPMI 1640 supplémenté de 0.25% de BSA. On ajoute 20 μ l d'anticorps monoclonaux spécifiques qui reconnaissent le récepteur étudié. Les cellules marquées sont laissées pendant 30 minutes à 4°C puis on procède à 3 lavages successifs dans du PBS froid (4°C). Par la suite, 100 μ l d'anticorps anti-Ig de souris fluoresceiné est ajouté au culot . Il a été dilué 1:200 dans du milieu RPMI 1640 additionné de 0.25% BSA et incubé 30 min à 4°C à l'obscurité. On refait 3 lavages au PBS froid. Les cellules sont resuspendues dans 400 μ l de PBS froid et sont analysées au FACscan (Becton Dinkinson, San Jose, CA).

Le principe de l'appareil FACscan est le suivant; les cellules sont aspirées dans l'appareil par une tige

capillaire; elles passent ensuite une à une devant un faisceau laser. Le faisceau excite le fluorochrome (495nm) qui est fixé à la cellule et les photomultiplicateurs (PMT) captent l'information qui est compilé par un ordinateur relié à l'appareil. A partir de la réflexion et de la dispersion de la lumière sur la cellule on obtient des informations plus générales (volume et granularité) qui sont également intégrées par l'ordinateur.

Si on veut analyser deux récepteurs différents sur la même cellule, on procède à un double marquage. Ceci consiste en l'ajout d'un autre anticorps monoclonal révélé par un second fluorochrome. Le fluorochrome utilisé est la phycoérythrine qui émet dans le spectre rouge au lieu du vert de la FITC. Le deuxième anticorps monoclonal, lié à la phycoérythrine, est ajouté aux cellules qui ont été marquées au préalable avec un premier anticorps monoclonal révélé par un anti-Ig fluorescéiné. On incube donc les cellules encore 30 min à 4°C et à la noirceur, puis on refait 3 lavages au PBS froid. Les cellules sont resuspendues dans 400 μ l de PBS froid et sont analysées au FACscan.

2.4.3 Buvar dage Northern

Les lymphocytes humains qui ont été préalablement purifiés sur fibronectine, ont été stimulés avec différentes concentrations de LTB_4 et incubées pendant de courtes périodes (0h, 1h, 3h). L'ARN total est extrait par la méthode AGPC (acid guanidium thiocyanate-phénol-chloroform) (Chomczynski et Sacchi, 1987). L'ARN ainsi extrait est quantifié par spectrophotométrie à 260nm et séparé par électrophorèse sur un gel d'agarose 1% supplémenté de MOPS 1X et de formaldéhyde 37%. L'ARN est transféré sur une membrane de nylon Hybond-N (Amersham, Cambridge, MA, USA) toute la nuit par capillarité. Le lendemain l'ARN est fixé aux U.V. pendant 20 sec. On préhybride la membrane pendant 4h à 68°C dans une solution contenant du Tris 120mM, du NaCl 600mM, de l'EDTA 8mM, du Napyrophosphate 0.1%, du SDS 0.2% et de l'héparine 100mg/ml. On hybride toute la nuit à 68°C dans une solution de même nature qui possède par contre 625mg/ml d'héparine et 10% de sulfate de dextran (Singh et Jones, 1984) ainsi que la sonde d'ADNc. Les sondes utilisées lors de l'hybridation sont un fragment XhoI de 1.7kb du clone IL2R β (cadeau du Dr. Warren J. Leonard, NIH, Bethesda MD) et un fragment PstI provenant du cDNA du GAPDH (glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase)(cadeau du Dr. C. Asselin, Université de Sherbrooke, Québec). Les sondes sont produites à l'aide du système de marquage "multiprime" (Amersham), utilisant du (αP^{32})dCTP (activité spécifique >

3000 Ci/mM, Amersham). Par la suite la membrane est lavée une fois à la température de la pièce pendant 20 min dans du 2X SSC (1X SSC: 0.15M NaCl, 0.015 M sodium citrate, pH7), puis 60 min, à 68°C dans du 0.1X SSC , 0.1% SDS et ensuite rincée à la température de la pièce dans du 0.1X SSC. La membrane est exposée à un film Kodak XAR-5 (Kodak, NY) à -80°C pendant 24h. Les bandes d'ARN révélées sont quantifiées par densitométrie au moyen d'un appareil Pharmacia LKB Ultrascan XL (Pharmacia, Canada). On enlève la sonde IL2R β de la membrane à l'aide d'un lavage pendant 60 min à 90°C dans du 0.02X SSC, 0.2% SDS. On peut ainsi réhybrider la membrane avec la sonde GAPDH qui sert d'étalon d'ARN .

2.4.4. Essai de cytotoxicité

Le test de cytotoxicité se base sur le principe du relâchement de chrome radioactif par les cellules mortes. Les cellules cibles, K562, en phase exponentielle de croissance sont resuspendues dans 1 ml de milieu RPMI 1640 additionné de 5% de FBS et incubées pendant 90 min, à 37°C avec 200uCi de $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ (Amersham, Cambridge, MA). Pendant le marquage des cellules cibles, on distribue les cellules effectrices, les lymphocytes, dans des plaques à fond rond de 96 puits (Costar, Cambridge, MA). Les cellules sont distribuées en dilutions doublantes dans un volume final de 100µl/puits. Les lymphocytes utilisés comme cellules effectrices ont été préalablement stimulées au LTB_4 à différentes concentrations pendant 24h à 37°C. Ces cellules ont été lavées et resuspendues à la concentration de 5×10^6 cellules/ml de milieu RPMI 1640 supplémenté de 5% de FBS. Aux cellules effectrices qui ont été distribuées dans les puits, on ajoute différentes concentrations d'IL-2 (0, 0.1, 1, 10, 100, 1000 U/ml).

Après avoir marqué les cellules cibles K562 au chrome radioactif, on les lave 3 fois avec du PBS et on les resuspend à une concentration de 1×10^5 cellules/ml de milieu RPMI 1640 plus 5% FBS. Par la suite on ajoute aux cellules effectrices 5×10^3 cellules cibles/puits. Ainsi différents ratios de cellules effectrices/cellules cibles

(E:C) sont obtenus, soit: 100:1, 50:1, 25:1, 12,5:1, respectivement.

Les plaques sont centrifugées à 130 g pendant 5 min et incubées pendant 4h à 37°C dans un incubateur humidifié avec 5% de CO₂, 95% d'air. A la fin de l'incubation, les plaques sont recentrifugées à 130 g pendant 5 min, et les surnageants récoltés (0.1ml) dans des tubes individuels. La radioactivité des surnageants est comptée au compteur gamma (Beckman Instruments Irvine, CA). Le pourcentage de cytotoxicité se mesure comme suit:

$$\% = 100 \times \frac{(\text{cpm de l'échantillon} - \text{cpm du spontané})}{(\text{cpm total} - \text{cpm du spontané})}$$

Le terme spontané correspond au relâchement de ⁵¹Cr par les cellules cibles en absence des cellules effectrices. Le total représente le ⁵¹Cr maximal qui peut être relâché par les cellules cibles traitées avec du détergent (SDS) à une concentration de 0.5%.

Par la suite on peut convertir le pourcentage de cytotoxicité en unités lytiques, grâce à un programme informatique (Pross et coll; 1981).

2.5 ANALYSE STATISTIQUE

La significativité des différences entre les groupes de résultats a été déterminée par l'analyse de variance. Un niveau de probabilité de $p < 0.05$ a été considéré comme étant significatif.

RESULTATS

3.1 Effet du LTB₄ sur l'activité NK des lymphocytes humains stimulée par l' IL-2

Il a été démontré dans notre laboratoire que le LTB₄ possédait des propriétés immunorégulatrices très importantes (Rola-Pleszczynski et coll., 1983, 1986; Rola-Pleszczynski et Lemaire, 1985). Il induit entre autre la production d'IL-2 chez les lymphocytes T. On sait également que le LTB₄ ainsi que l'IL-2 augmente l'activité cytotoxique des cellules NK. Il a donc été intéressant d'étudier l'activité cytotoxique des cellules NK stimulée par l'IL-2 chez des lymphocytes préalablement incubés avec du LTB₄.

Les lymphocytes sont au départ incubés pendant 24h en présence du véhicule (éthanol) ou du LTB₄ (0.1nM). On effectue par la suite un essai de cytotoxicité de 4h en présence de concentrations croissantes d'IL-2 (0.1-100U/ml). Les résultats présentés à la figure 2 démontrent une augmentation de sensibilité à l'IL-2. Les lymphocytes préincubés sans LTB₄ montrent un EC50 de 50U/ml d'IL-2 et une réponse maximale à 100U/ml d'IL-2. Tandis que ceux qui ont été en présence de LTB₄ montrent un EC50 de 0.5U/ml d'IL-2 et une réponse maximale à 10U/ml d'IL-2. Des résultats similaires ont été obtenus dans 3 autres expériences.

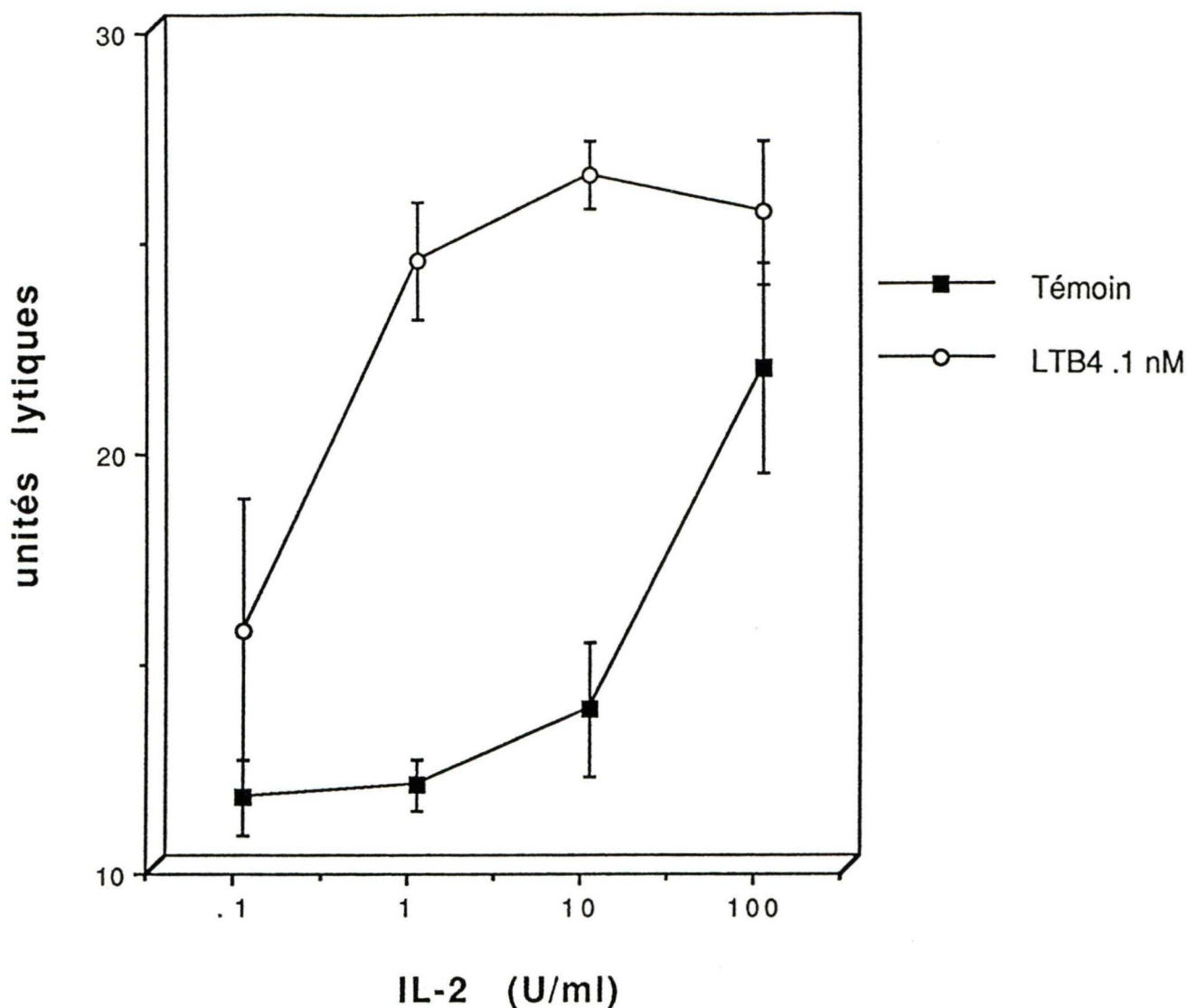


Fig.2 Effet du LTB₄ sur l'activité NK des lymphocytes humains stimulés par l'IL-2 . Les lymphocytes ont été préincubés pendant 24 h. avec le véhicule(éthanol) ou du LTB₄ (0.1nM) puis stimulés pendant 4 h. avec IL-2 (0.1-100 U/ml) en présence des cellules cibles K562 marquées au ⁵¹Cr . Les moyennes \pm l'erreur type de 3 expériences sont illustrées .

3.2 Effet du LTB_4 sur l'expression du $\text{IL2R}\beta$ chez des lymphocytes humains

3.2.1 Lymphocytes

A l'aide d'anticorps spécifiques, il a été démontré que la chaîne β du récepteur de IL-2 était responsable de la cytotoxicité des lymphocytes NK induite par l'IL-2. Nous avons donc étudié l'effet du LTB_4 sur l'expression du $\text{IL2R}\beta$ sur ces cellules. Les lymphocytes ont été préincubés en présence de concentrations croissantes de LTB_4 (10^{-12} - 10^{-6}M) pendant 24h et analysés par cytofluorométrie. La figure 3 indique que les cellules préincubées avec le véhicule (éthanol) donne 32% de cellules $\text{IL2R}\beta^+$. Tandis qu'à la concentration de 10^{-8}M de LTB_4 , il y a une augmentation significative de l'expression du $\text{IL2R}\beta$; de 32% à 52% de cellules $\text{IL2R}\beta^+$. En présence de 10^{-10}M de LTB_4 , cette valeur augmente de 32% à 43%. Aux concentrations plus élevées et plus basses, on n'observe aucun changement dans l'expression de $\text{IL2R}\beta$.

Parallèlement à cette étude, nous avons vérifié l'expression du $\text{IL2R}\beta$ à l'aide de deux stimuli qui ont un effet bien connu sur ce récepteur chez les lymphocytes. Nous avons stimulé ceux-ci avec de la PHA (0.1%) ou avec du l'IL-4 (100U/ml). Nous obtenons une augmentation significative d'expression du $\text{IL2R}\beta$ avec la PHA (32% à 49%) et une diminution significative en présence d'IL-4 (32% à

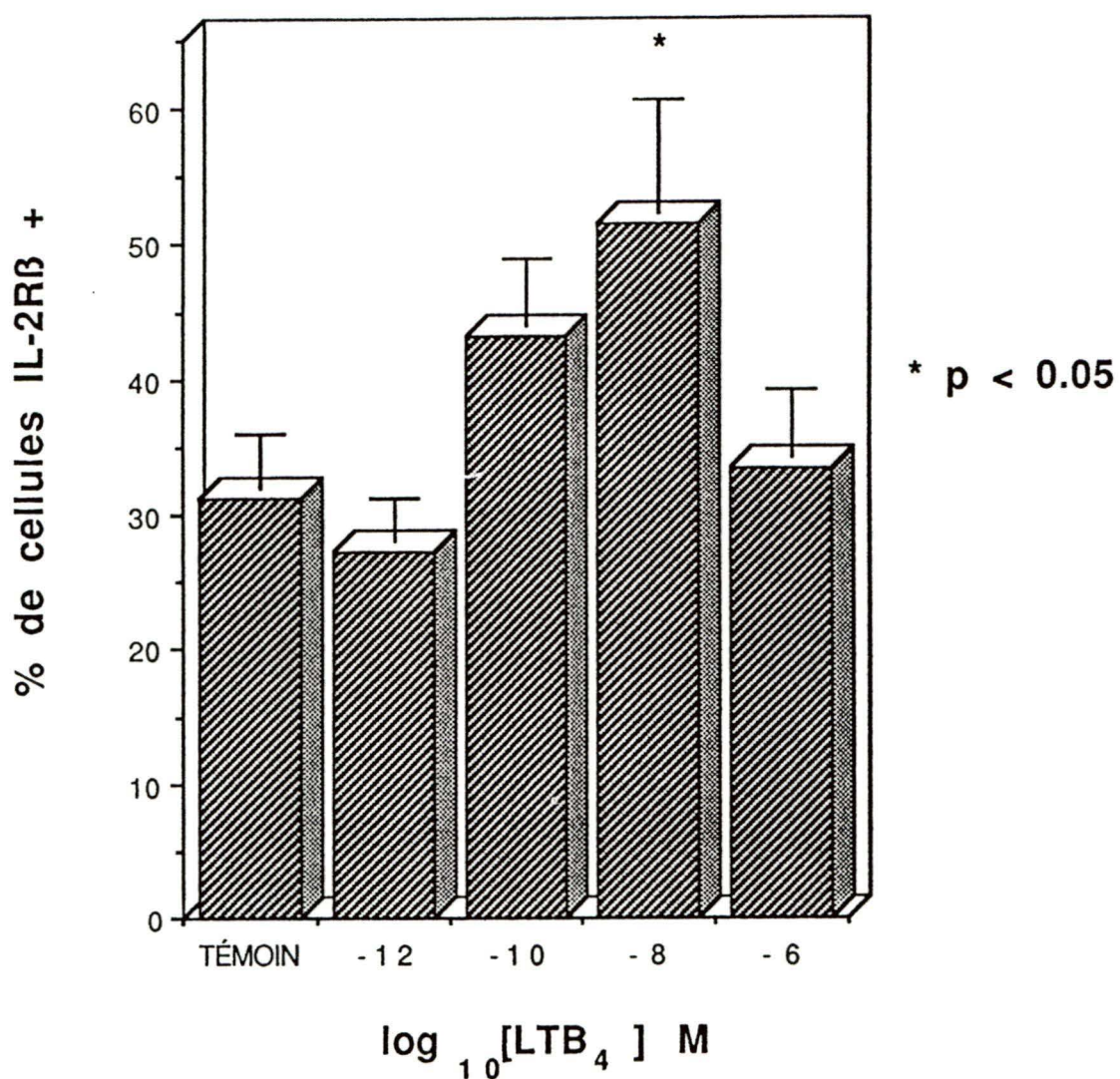


Fig.3 Effet du LTB_4 sur l'expression du IL-2R β chez des lymphocytes humains . Les lymphocytes ont été préincubés pendant 24 h. avec le véhicule(éthanol) ou du LTB_4 (10^{-12} - 10^{-6} M) . Le pourcentage de cellules IL-2R β^+ a été mesuré par cytofluorométrie . Les moyennes \pm l'erreur type de 5 expériences sont illustrées .

15%) (Figure 4). Il est à remarquer que l'augmentation obtenue avec le LTB_4 10^{-8}M (Fig 3) est comparable à celle obtenue avec de la PHA 0.1%.

3.2.2 Sous-populations lymphocytaires

Nous avons analysé la modulation d'expression du $\text{IL2R}\beta$ par LTB_4 sur différentes sous-populations lymphocytaires. C'est à l'aide de la méthode de double marquage que cette étude a été effectuée. Les lymphocytes ont été préincubés pendant 24h en présence du véhicule (éthanol) ou du LTB_4 (10^{-10} - 10^{-8}M). Ces cellules ont été marquées avec de l'anti- $\text{IL2R}\beta$ et par la suite avec de l'anti-CD8, de l'anti-CD4 ou de l'anti-CD56 conjugués à la phycoérythrine.

Nous remarquerons que les sous populations CD56^+ et CD8^+ expriment le $\text{IL2R}\beta$ (fig 5A et 5B). Lorsque préincubées avec du LTB_4 , elles montrent une augmentation d'expression du $\text{IL2R}\beta$. Celle-ci est plus importante chez les cellules CD56^+ . La sous-population CD4^+ montre un faible niveau d'expression du $\text{IL2R}\beta$ et on n'observe aucun changement chez les lymphocytes CD4^+ traitées au LTB_4 . (Fig 5C)

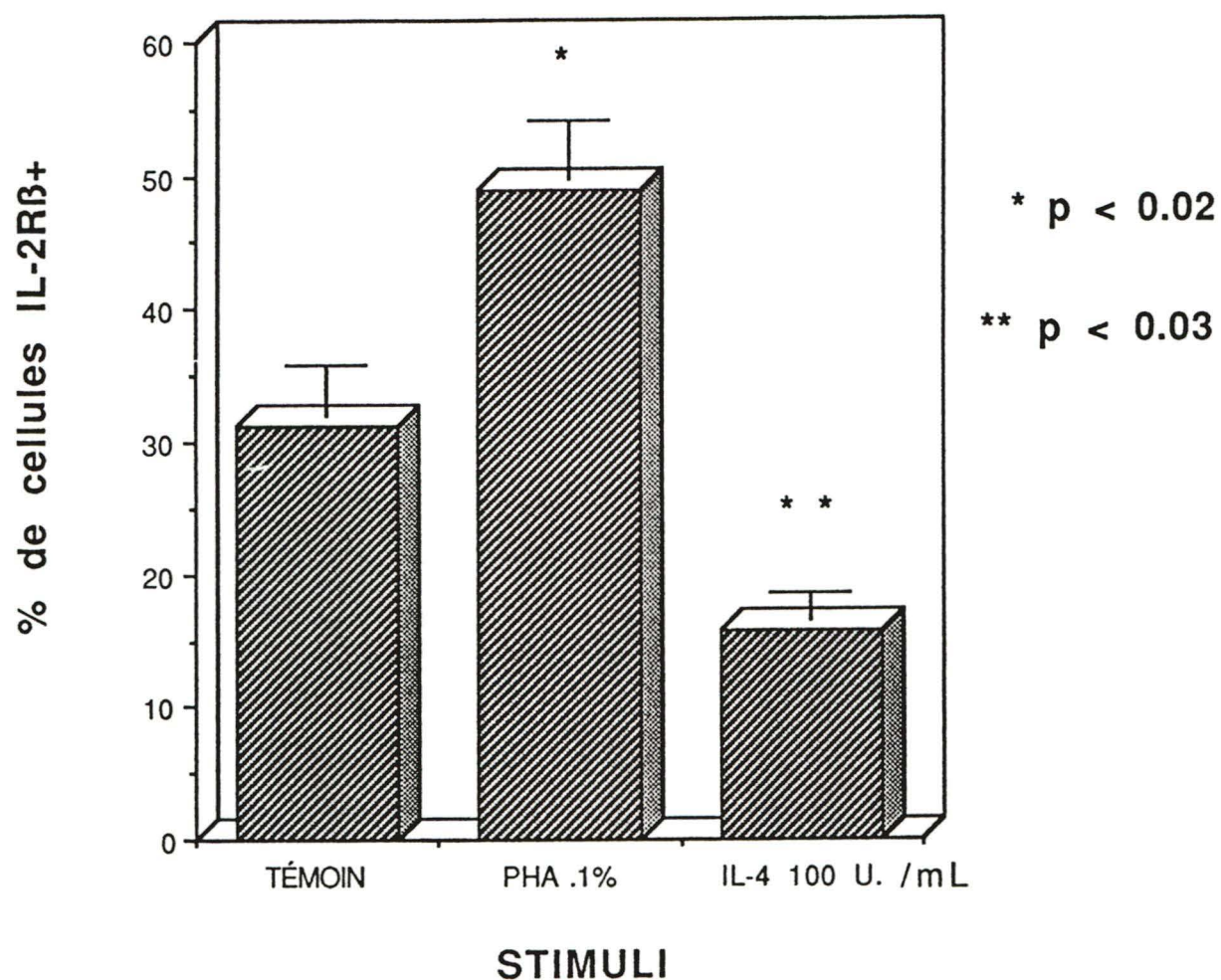


Fig.4 Effet de l'IL-4 et de la PHA sur l'expression du IL-2R β chez des lymphocytes humains . Les lymphocytes ont été préincubés avec le véhicule(éthanol) , l'IL-4 (100 U/ml) ou la PHA 0.1% pendant 24 h. .Le pourcentage de cellules IL-2R β ⁺ a été mesuré par cytofluorométrie . Les moyennes \pm l'erreur type de 8 expériences sont illustrées .

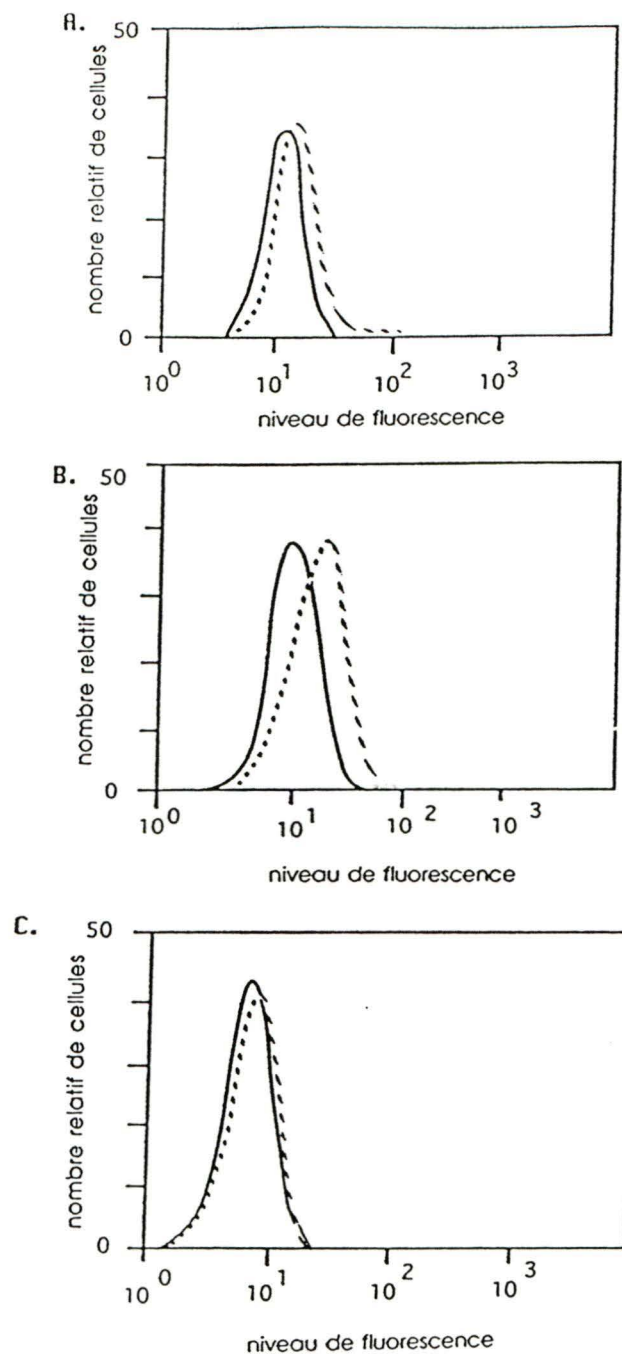


Fig.5

Effet du LTB_4 sur l'expression du IL-2R β chez les différentes sous-populations lymphocytaires humaines . Les cellules A) CD8⁺ B) CD56⁺ C) CD4⁺ ont été préincubées avec le véhicule(éthanol) (—) ou du LTB_4 10^{-8} M (----) pendant 24 h. Le niveau de fluorescence des cellules IL-2R β^+ a été analysé par cytofluorométrie à l'aide de la méthode du double marquage . Des résultats similaires ont été obtenus dans 3 autres expériences .

3.3 Cinétique de l'expression de IL2R β chez les lymphocytes préincubés avec du LTB $_4$

Nous observons une augmentation d'expression de la chaîne β sur des lymphocytes après 24h d'incubation avec du LTB $_4$. Nous avons vérifié si cet effet est de plus longue durée. Les figures 6A et 6B montrent qu'après 48h d'incubation avec du LTB $_4$, l'expression du IL2R β revient au même niveau que celui du témoin.

3.4 Effet du LTB $_4$ sur l'expression de l'ARNm du IL2R β chez les lymphocytes humains

Comme la protéine IL2R β , est modulée par le LTB $_4$, nous avons vérifié si le LTB $_4$ modulait l'expression de l'ARNm du IL2R β . Nous avons stimulé des lymphocytes pendant 1h et 3h avec du LTB $_4$ (10^{-12} - 10^{-6} M). Par la suite l'ARNm a été extrait et hybridé avec une sonde cADN d'IL2R β .

Les résultats obtenus (Fig 7A et 7B) indiquent qu'après 3h d'incubation avec du LTB $_4$, les lymphocytes montrent une augmentation significative de l'expression de l'ARNm du IL2R β . Celle-ci est visible à toutes les concentrations de LTB $_4$ mais est maximale à 10^{-8} M. Le rapport IL2R β /GAPDH augmente de 0.6 à 1.2 en présence de LTB $_4$ (10^{-8} M). Comme témoin positif, la PHA (0.1%) induit

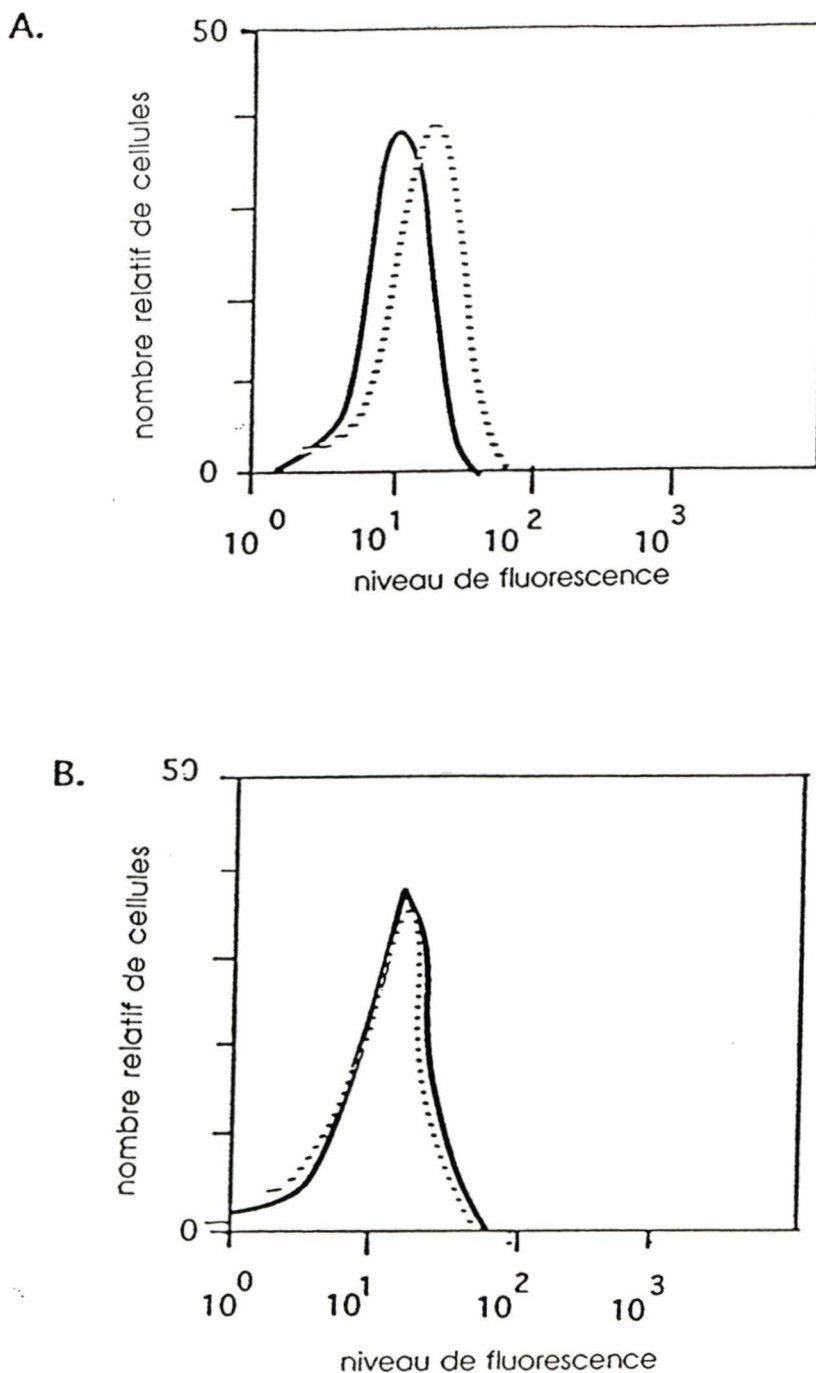


Fig.6

Variation de l'expression du IL-2R β chez des lymphocytes humains traités au LTB $_4$. Les lymphocytes ont été préincubés pendant A) 24 h. B) 48 h. avec le véhicule(éthanol) (—) ou du LTB $_4$ 10^{-8} M (---). Le niveau de fluorescence des cellules IL-2R β^+ a été analysé par cytofluorométrie . Des résultats similaires ont été obtenus dans 3 autres expériences .

également une augmentation qui est semblable à celle trouvée avec du LTB_4 10^{-8}M .

3.5 Effet du LTB_4 sur les niveaux d'expression du $\text{IL2R}\beta$ chez les monocytes humains

Au repos, les monocytes expriment $\text{IL2R}\beta$ de façon constitutive. Nous avons voulu vérifier si l' $\text{IL2R}\beta$ présent chez les monocytes était également modulé par le LTB_4 comme dans le cas des lymphocytes. Nous avons donc préincubé des monocytes humains avec des concentrations croissantes de LTB_4 (10^{-12} - 10^{-6}M) pendant 24h et analysé l'expression du $\text{IL2R}\beta$ par cytofluorométrie.

Nous observons une augmentation significative de l'expression de ce récepteur aux concentrations de 10^{-8}M et 10^{-6}M de LTB_4 . Au repos, les monocytes possèdent 25% de cellules $\text{IL2R}\beta^+$. En présence d'une concentration de 10^{-6}M de LTB_4 (Fig. 8), on augmente le nombre de cellules $\text{IL2R}\beta^+$ à 45% et avec une concentration de 10^{-8}M de LTB_4 on augmente à 49%. Aux concentrations plus faibles, il n'y a aucun changement. L'augmentation d'expression obtenue avec le LTB_4 10^{-8}M est comparable à celle obtenue avec de la PHA 0.1% (25% à 50%)(Fig. 9). En présence d' IL-4 , on remarque une diminution significative d'expression du $\text{IL2R}\beta$; 25% à 10%. La figure 10A et 10B montre la cinétique d'expression du $\text{IL2R}\beta$ chez des monocytes préincubés au LTB_4 .

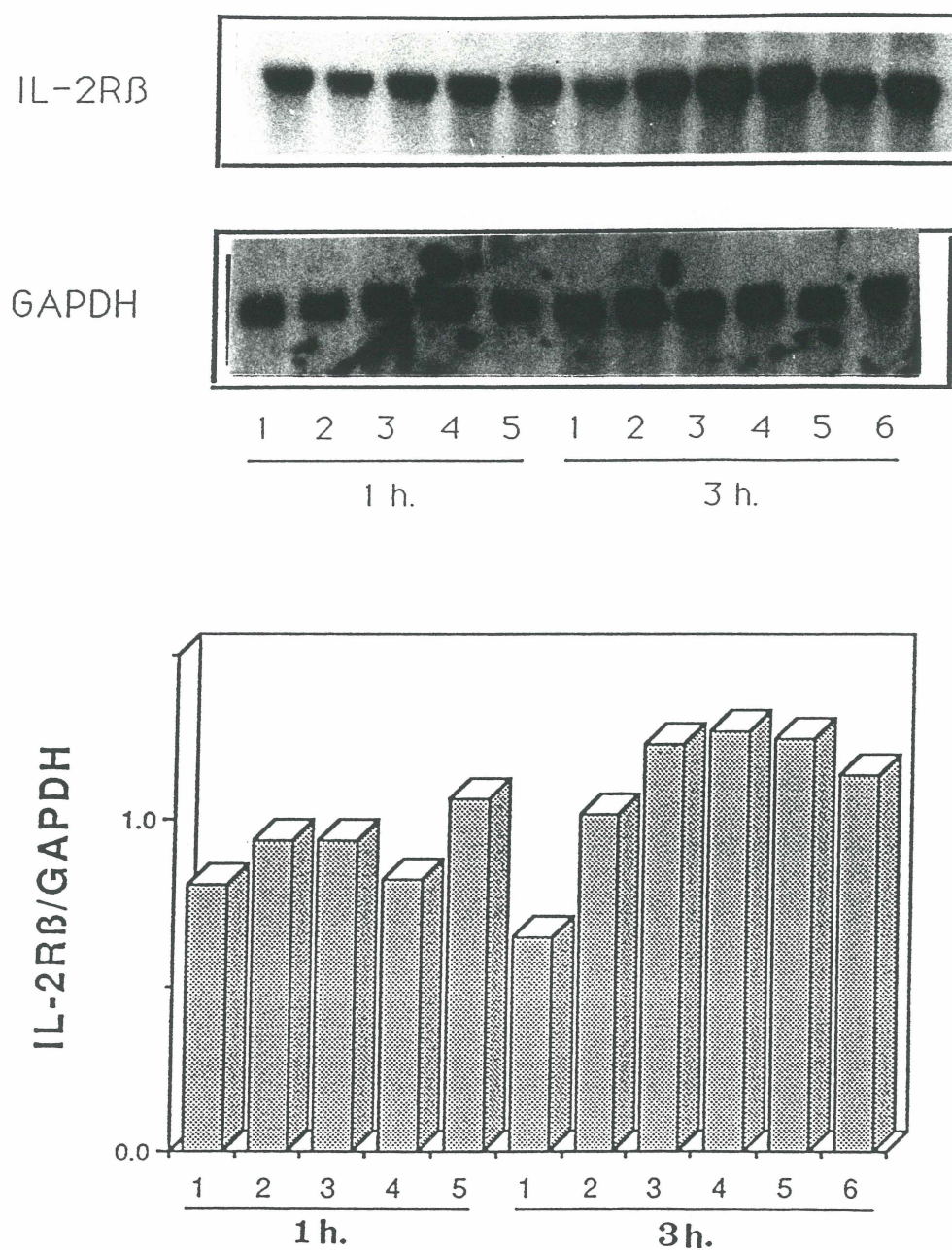


Fig.7

Effet du LTB₄ sur l'expression de l'ARNm du IL-2Rβ chez des lymphocytes humains. Les lymphocytes ont été stimulés avec 1) le véhicule (éthanol) 2) PHA 0.1% 3) LTB₄ 10⁻⁶ M 4) LTB₄ 10⁻⁸ M 5) LTB₄ 10⁻¹⁰ M 6) LTB₄ 10⁻¹² M pendant 1 h. ou 3 h. Le rapport IL-2Rβ/GAPDH a été établi à partir de données densitométriques. Des résultats similaires ont été obtenus dans 3 autres expériences.

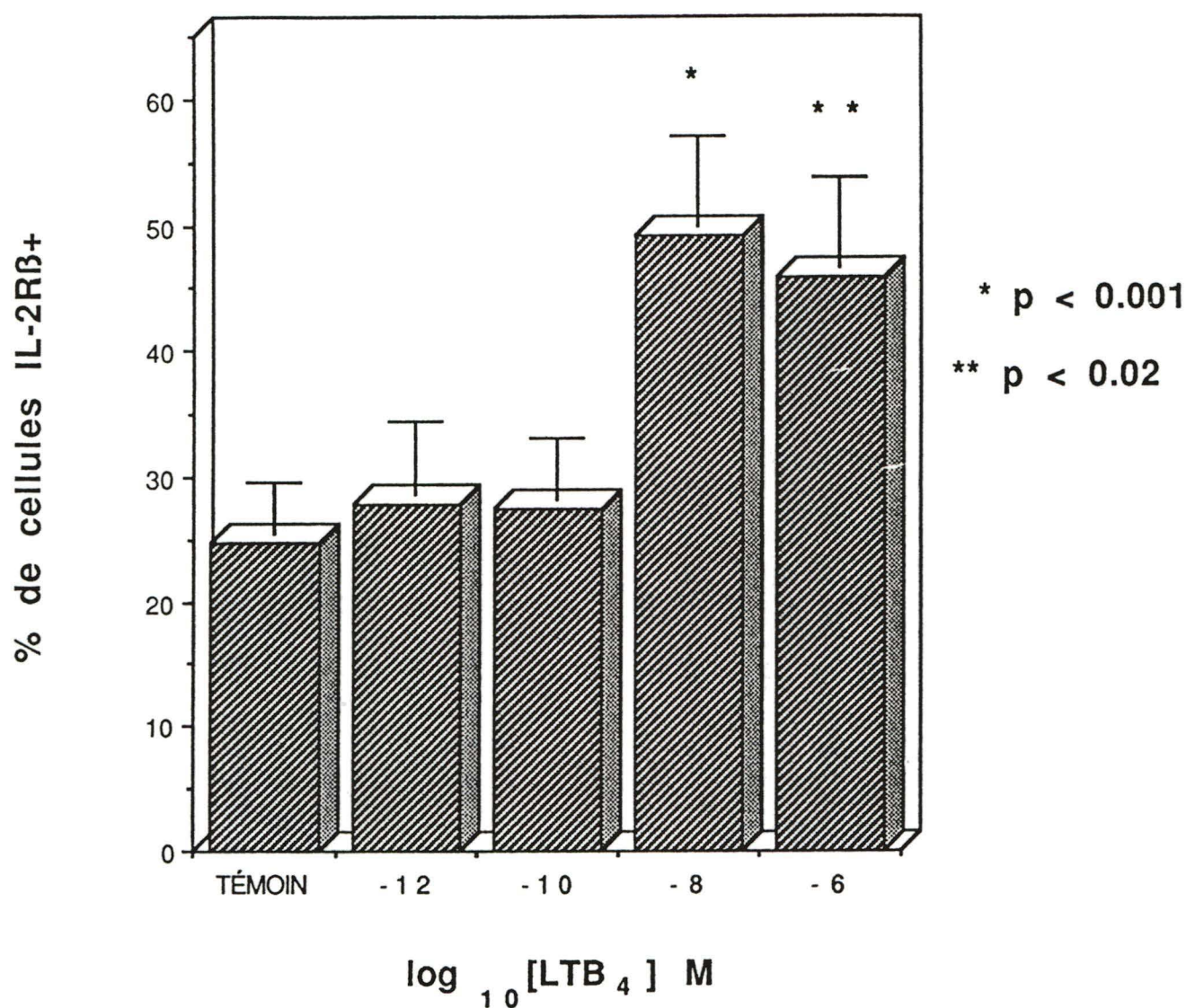


Fig.8 Effet du LTB₄ sur l'expression du IL-2Rβ chez des monocytes humains . Les monocytes ont été préincubés pendant 24 h. avec le véhicule(éthanol) ou du LTB₄ (10^{-12} à 10^{-6} M) . Le pourcentage de cellules IL-2Rβ⁺ a été mesuré par cytofluorométrie . Les moyennes ± l'erreur type de 5 expériences sont illustrées

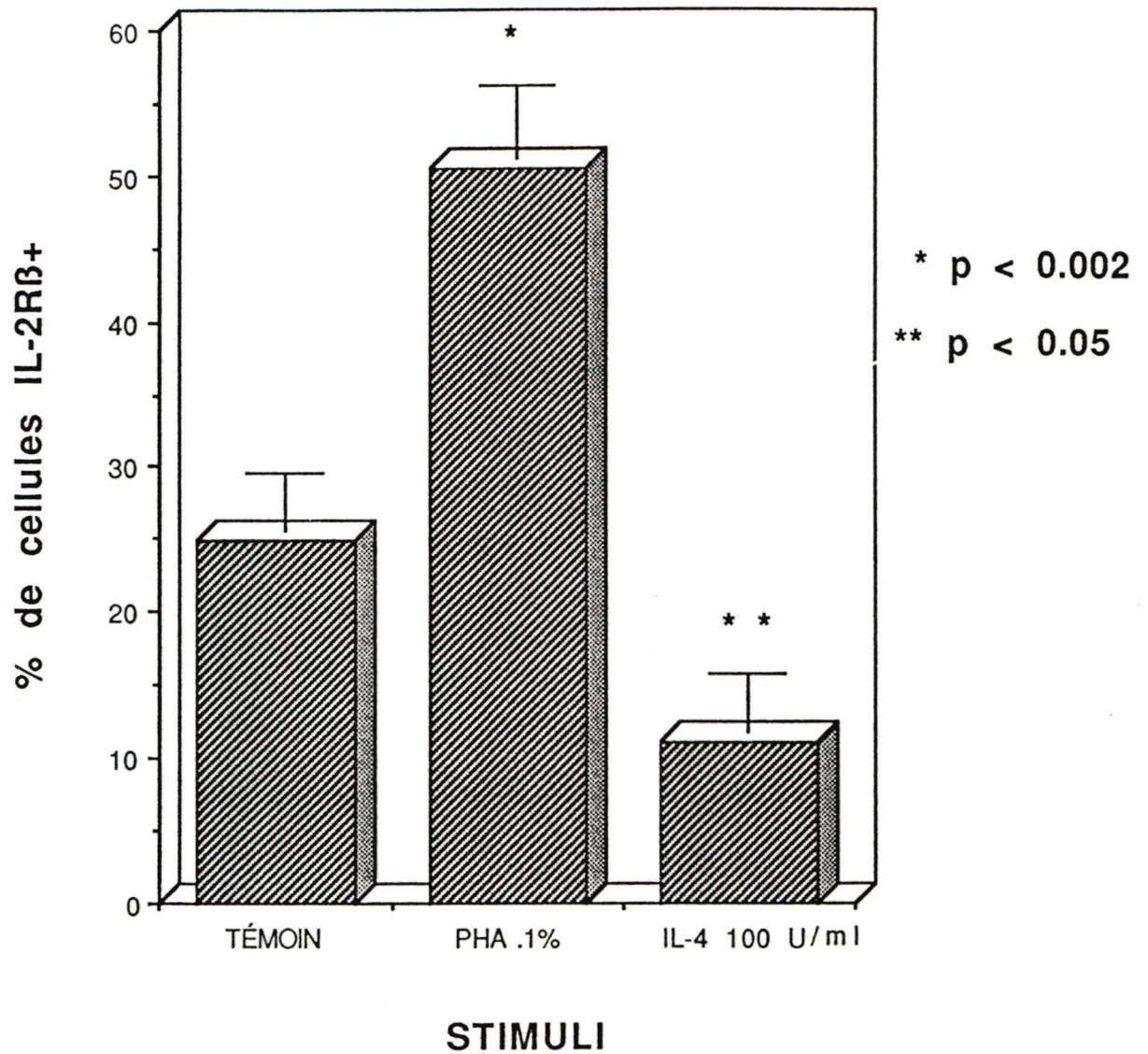


Fig.9

Effet de l'IL-4 et de la PHA sur l'expression du IL-2R β chez des monocytes humains . Les monocytes ont été préincubés avec le véhicule(éthanol) ou de l'IL-4 (100 U/ml) ou de la PHA 0.1% pendant 24 h. .Le pourcentage de cellules IL-2R β ⁺ a été mesuré par cytofluorométrie . Les moyennes \pm l'erreur type de 7 expériences sont illustrées .

L'augmentation observée à 24h persiste toujours après 48h d'incubation avec du LTB₄.

3.6 Effet du LTB₄ et du PAF sur l'expression de CD23

3.6.1 Monocytes humains

Durant les réactions allergiques plusieurs processus amènent, entre autres, la libération d'une série de médiateurs lipidiques (LTB₄, PAF) responsables des réactions immédiates dans l'allergie. De plus, on sait qu'il existe deux types de récepteurs pour les IgE, un de forte affinité et un de faible affinité. Ce dernier appelé CD23 se retrouve sur diverses cellules du système immunitaire dont, entre autres, sur les cellules de la lignée myéloïde (Melewicz et coll., 1982a; 1982b). Il était intéressant d'étudier si des médiateurs lipidiques importants dans les allergies avaient un effet sur l'expression de CD23.

Nous avons exposé des monocytes humains à des concentrations croissantes de PAF (10^{-12} M à 10^{-6} M) et de LTB₄ (10^{-12} M à 10^{-8} M) pendant 24h, 48h et 72h. Après analyse par cytofluorométrie, nous ne constatons aucune augmentation d'expression du CD23, même après 72h d'incubation sur les cellules traitées avec du PAF ou du LTB₄ (Tableau 2).

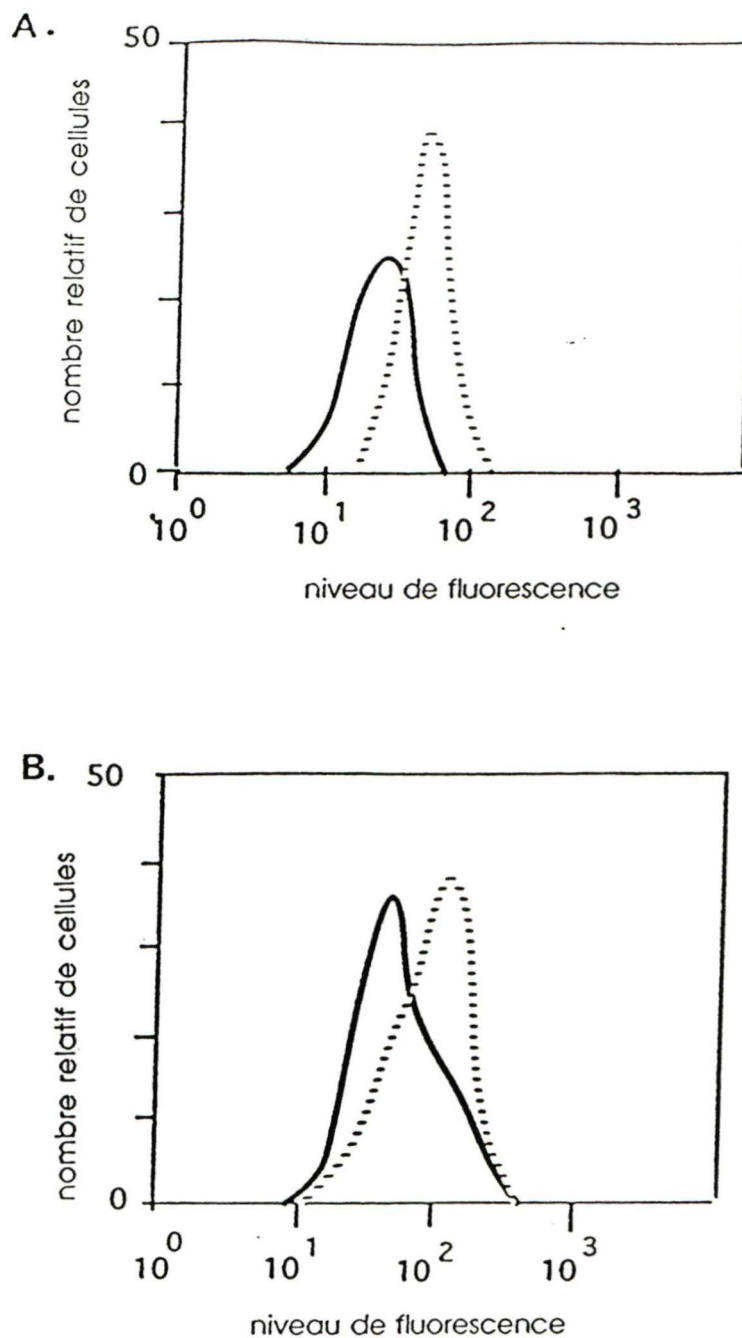


Fig.10 Variation de l'expression du IL-2R β chez des monocytes humains traités au LTB $_4$. Les monocytes ont été préincubés avec le véhicule(éthanol) (—) ou du LTB $_4$ 10^8 M (---) pendant A) 24 h. B) 48 h. . Le niveau de fluorescence des cellules IL-2R β^+ a été analysé par cytofluorométrie . Des résultats similaires ont été obtenus dans 3 autres expériences .

TABEAU 2 EFFET DU PAF ET DU LTB₄ SUR L'EXPRESSION
DE CD23 CHEZ LES MONOCYTES HUMAINS ET LES CELLULES U937

CELLULES STIMULI	% de cellules CD23+	
	MONOCYTES HUMAINS	CELLULES U937
Témoin	1.7 + 0.3	32.5 + 6.4
PAF .01pM	1.0 + 0.2	27.0 + 0.9
PAF .1pM	2.0 + 0.7	29.6 + 0.9
PAF .1nM	1.8 + 0.8	34.4 + 3.1
PAF 1pM	2.1 + 0.3	33.9 + 4.2
PAF 10nM	1.6 + 0.1	28.8 + 2.1
PAF 1μM	1.5 + 0.6	34.0 + 2.1
LTB ₄ .1pM	2.2 + 0.3	29.1 + 4.0
LTB ₄ 1pM	2.2 + 0.5	27.8 + 3.9
LTB ₄ .1nM	1.8 + 0.4	34.8 + 2.1
LTB ₄ 10nM	1.7 + 0.8	30.8 + 6.2

Les résultats exprimés sont les moyennes \pm l'erreur type d'au moins 4 expériences dans lesquelles les cellules ont été incubées 48 h. avec ou sans stimulus.

Nous avons également exposé des monocytes humains à des concentrations croissantes d'IL-4 et d'IFN γ (10-200U/ml) pendant 24 à 72h. (Figure 11A et 11B). Après analyse, on observe une augmentation d'expression du CD23 en présence d'IL-4 ; celle-ci est maximale à une concentration de 100U/ml et à une incubation de 48h (2% de cellules CD23⁺ à 11%). Les monocytes stimulés avec l'IFN γ ne montrent aucun changement dans l'expression du CD23. Nous avons vérifié par la suite si l'IFN γ supprimait l'effet du IL-4. La figure 12 démontre qu'en présence simultanée d'IL-4 100U/ml et d'IFN γ 100U/ml, on obtient la même augmentation qu'avec l'IL-4 seule.

3.6.2 Les cellules U937

Les cellules U937 sont une lignée promyéломonocytaire qui expriment le CD23 de façon constitutive (env. 30% de cellules sont positives). On sait que l'expression du CD23 est variable et dépend du type cellulaire et du stade de différenciation des cellules (Kawabe et coll., 1988; Beeber et coll., 1989). C'est ainsi que nous avons voulu étudier la modulation d'expression du CD23 par le LTB₄ et le PAF sur les U937.

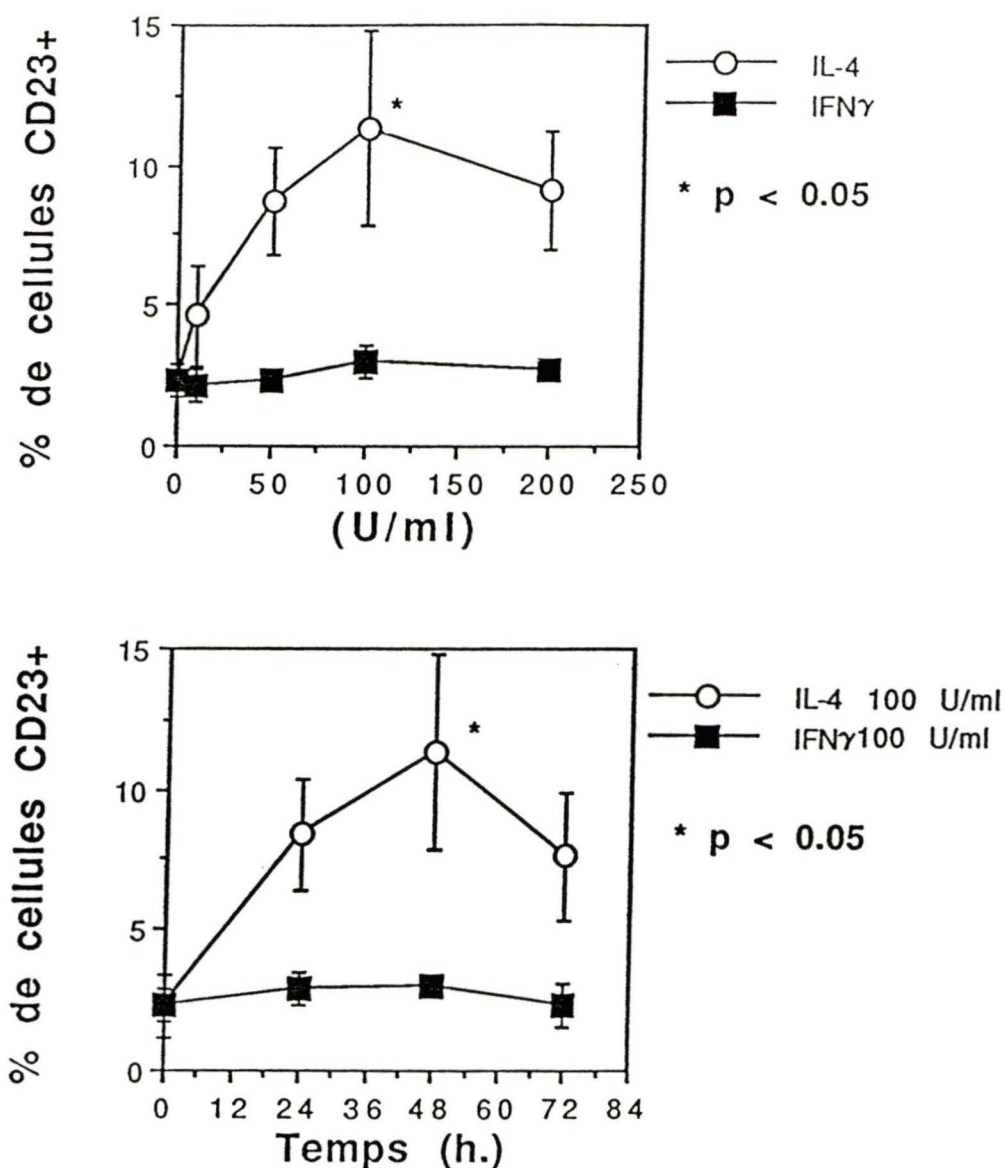


Fig.11

Effet de l'IL-4 et de l'IFN γ sur l'expression de CD23 chez les monocytes humains . A) Courbe dose-réponse des monocytes préincubés pendant 48 h. avec l'IFN γ ou l'IL-4 (10 ,50, 100, 200 U/ml) . B) Cinétique d'expression du CD23 sur les monocytes préincubés avec l'IFN γ ou l'IL-4 (100 U/ml) pendant 0 h., 24 h., 48 h. et 72 h. . Le pourcentage de cellules CD23 $^{+}$ a été analysé par cytofluorométrie . Les moyennes \pm l'erreur type de 8 expériences sont illustrées .

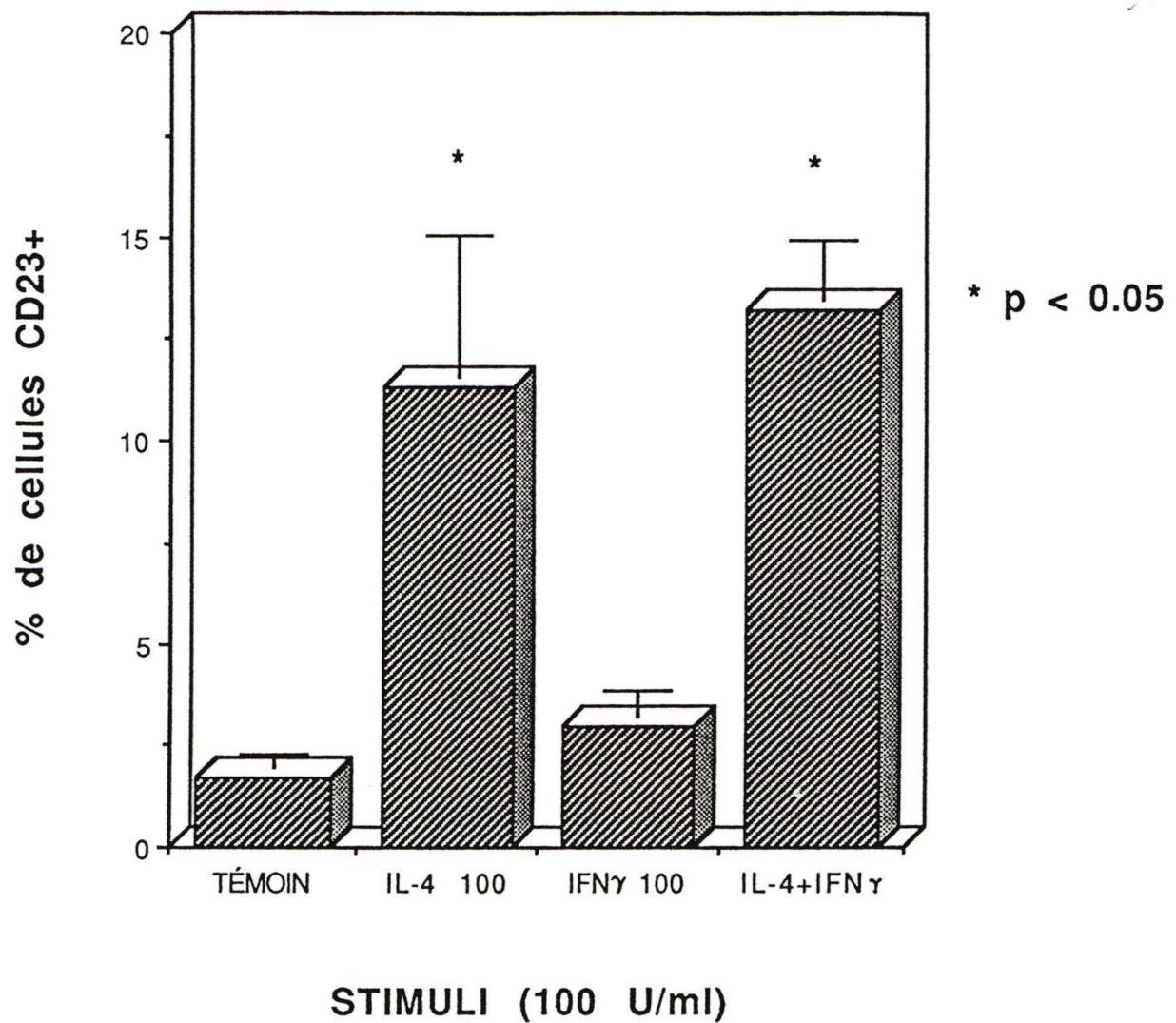


Fig.12 Effet de l'IL-4 et de l'IFN γ seuls ou combinés , sur l'expression de CD23 chez les monocytes humains . Les monocytes ont été préincubés pendant 48 h. avec l'IL-4 et/ou l'IFN γ (100 U/ml). Le pourcentage de cellules CD23⁺ a été analysé par cytofluorométrie . Les moyennes \pm l'erreur type de 8 expériences sont illustrées .

Nous avons stimulé les cellules U937 à des concentrations croissantes de PAF (10^{-12} - 10^{-6} M) et de LTB₄ (10^{-12} - 10^{-8} M) pendant 24 à 72h. Nous n'obtenons aucune augmentation de CD23 par ces médiateurs lipidiques sur les cellules U937. Ces résultats sont comparables à ceux observés sur les monocytes humains. (Tableau 2).

Les cellules U937 ont été stimulées également avec des concentrations croissantes d'IL-4 et d'IFN γ (10-200U/ml) pendant 24 à 72h d'incubation (Figure 13A et 13B). Nous avons observé une augmentation de l'expression du CD23 en présence d'IL-4 ou d'IFN γ . C'est à la concentration de 100U/ml et 48hr d'incubation que l'on obtient l'augmentation la plus élevée pour les deux cytokines. On augmente de 32% de cellules CD23⁺ à 50% pour IL-4 (100U/ml) et à 52% pour IFN γ (100U/ml). Les résultats obtenus avec IFN γ sont très différents de ceux observés dans le cas des monocytes humains, où on n'observait aucune augmentation. Si on stimule simultanément les cellules U937 avec l'IFN γ (100U/ml) et l'IL-4 (100U/ml), on obtient une réponse qui n'est cependant ni additive ni synergique (Figure 14). De la même façon que chez les monocytes, l'IFN γ ne supprime pas l'effet de l'IL-4.

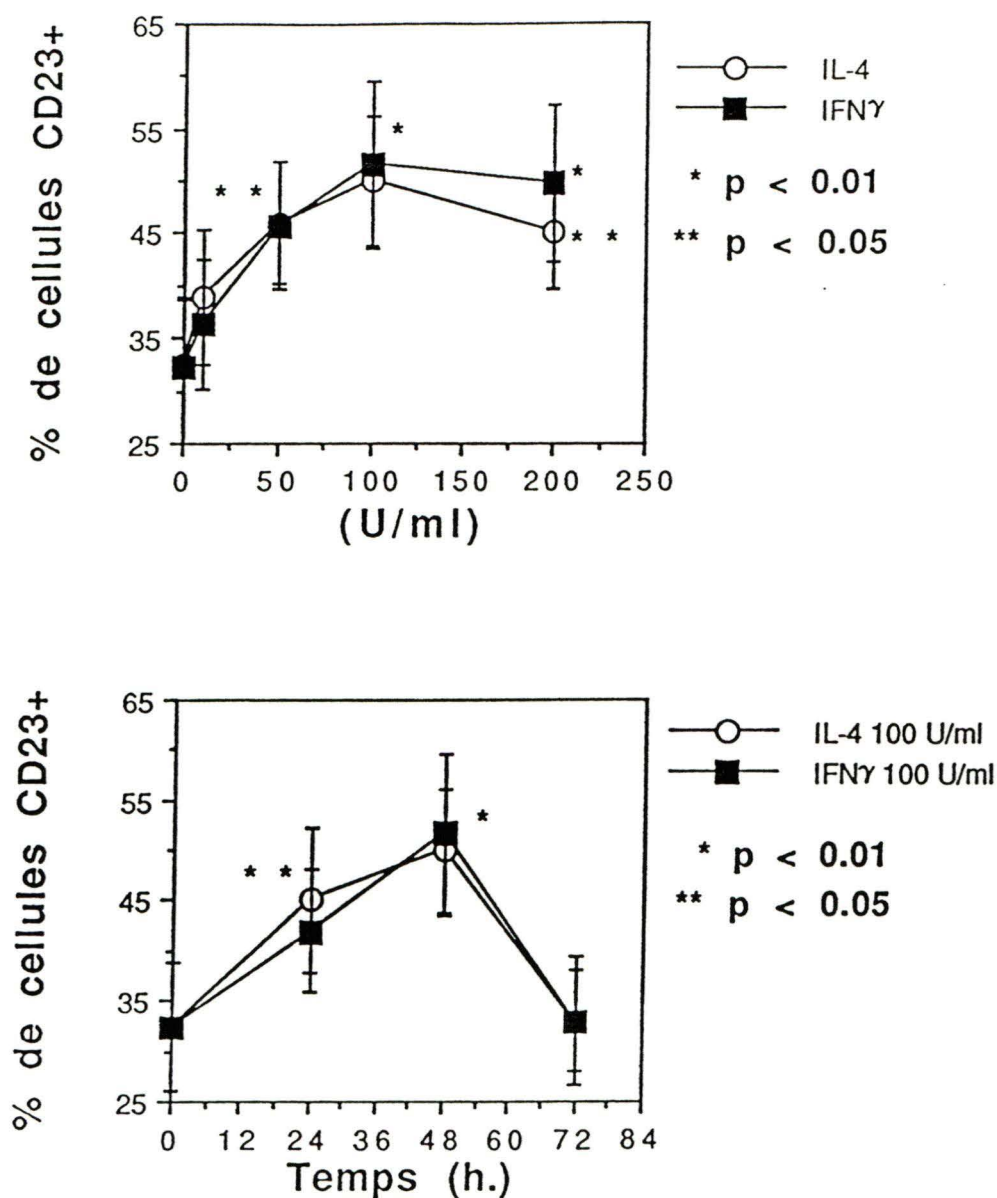


Fig.13 Effet de l'IL-4 et de l'IFN γ sur l'expression de CD23 chez des cellules U937 . A) Courbe dose-réponse des cellules U937 préincubées 48 h. avec l'IFN γ ou l'IL-4 (10, 50, 100, 200 U/ml). B) Cinétique d'expression de CD23 sur les cellules U937 préincubées avec l'IFN γ ou l'IL-4 (100 U/ml) pendant 0 h., 24 h., 48 h. et 72 h. . Le pourcentage de cellules CD23+ a été analysé par cytofluorométrie. Les moyennes \pm l'erreur type de 8 expériences sont illustrées .

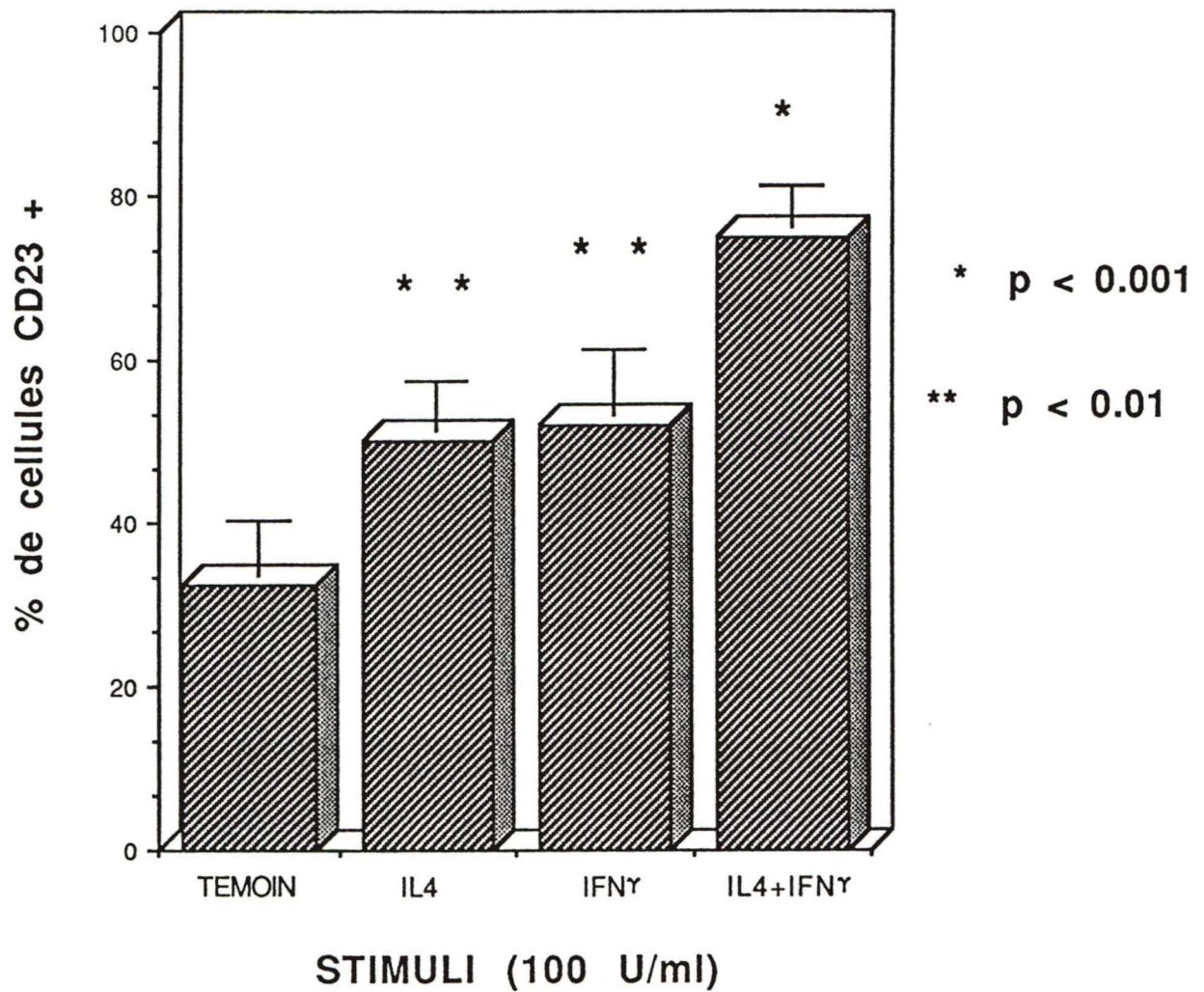


Fig.14

Effet de l'IL-4 et de l'IFN γ seuls ou combinés, sur l'expression de CD23 chez des cellules U937. Les cellules U937 ont été préincubées 48 h. avec l'IL-4 et/ou l'IFN γ (100 U/ml). Le pourcentage de cellules CD23⁺ a été analysé par cytofluorométrie. Les moyennes \pm l'erreur type de 8 expériences sont illustrées.

3.7 Effet de l'IL-4 et de l'IFN γ sur l'expression de CD23 sur les monocytes d'une patiente atteinte du Syndrome de Job-Buckley

Au cours de ma maîtrise, notre laboratoire a suivi de près l'état d'une patiente atteinte du syndrome de Job-Buckley. Ce syndrome est associé, entre autres, à des infections à Staphylocoque récurrentes, de l'eczema, de l'éosinophilie et une concentration très élevée d'IgE dans le sérum. Il était intéressant de comparer le niveau de base du CD23 sur les monocytes de cette patiente à celui de témoins normaux. Nous avons également étudié les monocytes de la patiente en termes de réponse à l'IL-4 (50-100U/ml) et à l'IFN γ (100U/ml) pendant 48h (Figure 15).

Au repos, les monocytes humains normaux ont un pourcentage d'expression de CD23 de 2%. Tandis que de base les monocytes de la patiente montrent un pourcentage d'expression de 60%. Si on stimule ces derniers avec l'IL-4 (50-100U/ml), on observe une augmentation d'expression du CD23 qui plafonne en présence de 50-100U/ml d'IL-4 (60% à 95% des cellules CD23⁺). Cette augmentation n'est pas affectée par l'IFN γ (100U/ml). L'IFN γ seul ne provoque aucune augmentation d'expression de CD23.

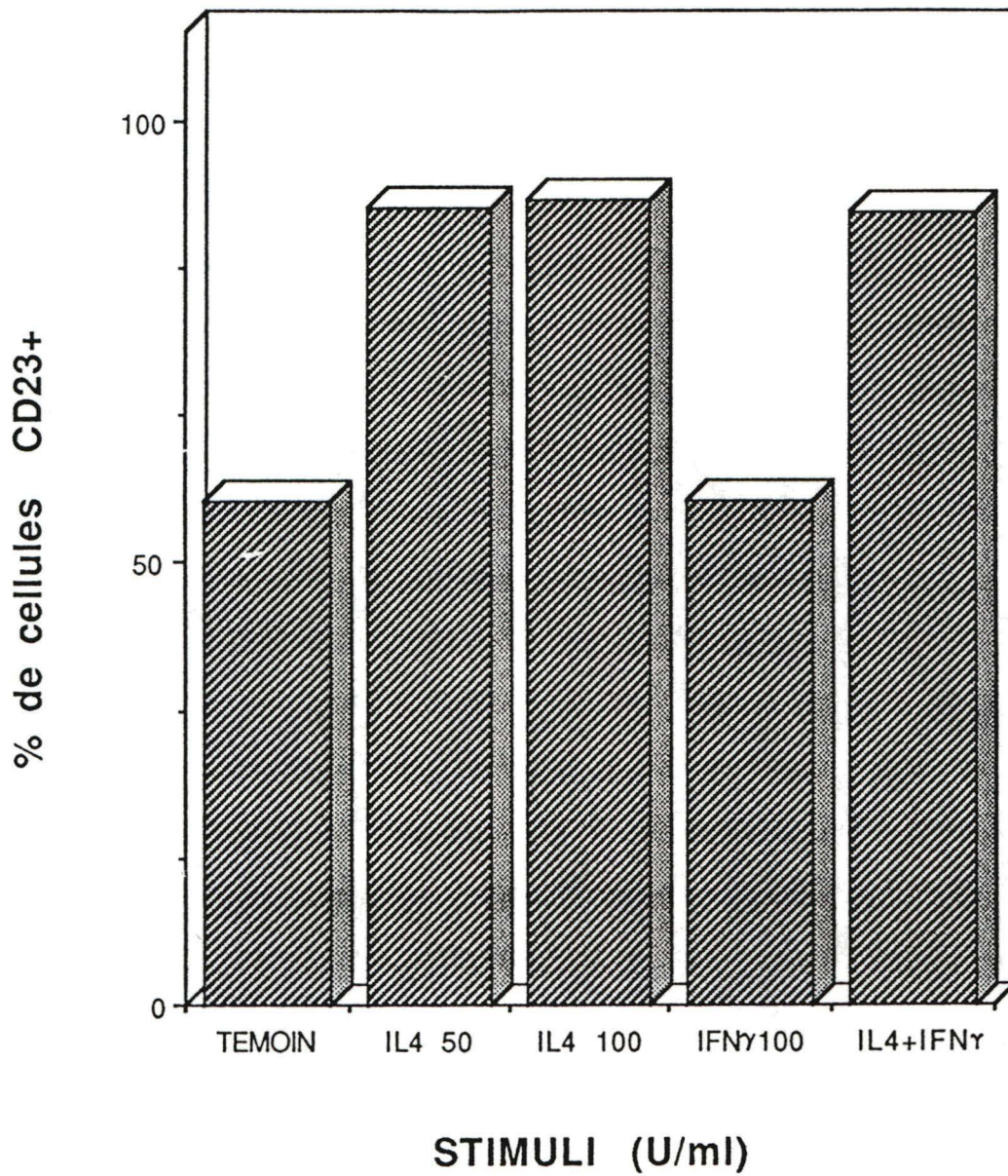


Fig.15

Effet de l'IL-4 et de l'IFN γ sur l'expression de CD23 chez des monocytes d'une patiente atteinte du syndrome de Job-Buckley . Les monocytes ont été préincubés pendant 48 h. avec l'IL-4 (50, 100 U/ml) ou l'IFN γ (100 U/ml) seuls ou en combinaison . Le pourcentage de cellules CD23⁺ a été analysé par cytofluorométrie . Les résultats exprimés proviennent d'une seule expérience .

DISCUSSION

Les connaissances se rapportant au récepteur de l'IL-2 sont de plus en plus nombreuses. C'est en 1980 que Kendall A. Smith mis en évidence ce récepteur (Smith, 1980). Depuis ce temps plusieurs découvertes ont permis de mieux connaître la distribution de ce récepteur et plusieurs de ses activités biologiques grâce à la découverte d'anticorps spécifiques dirigés contre les 2 chaînes principales du récepteur de l'IL-2 (Uchiyama et coll., 1981; Takeshita et coll., 1989). On sait par exemple que la chaîne β de l'IL2R β est impliquée dans la stimulation de l'activité cytotoxique des lymphocytes et des monocytes par l'IL-2 (Phillips et coll., 1989; Espinoza-Delgado et coll., 1990).

Le LTB₄ possède également des effets importants sur l'activité cytotoxique des monocytes et des lymphocytes. Il était donc intéressant d'étudier les interactions possibles entre le LTB₄ et l'IL2R β . C'est ainsi que pour la première fois nous avons démontré que le LTB₄ augmente la sensibilité des cellules NK en réponse à l'IL-2 suite à une augmentation de l'expression du IL2R β à la surface de ces cellules.

Les lymphocytes humains sont rapidement activés par l'IL-2; ils montrent une augmentation de cytotoxicité contre des cibles sensibles à l'activité NK et, lors d'une

exposition plus longue à l'IL-2, on observe une augmentation de cytotoxicité contre des cibles résistantes aux cellules NK.

Dans notre étude, nous avons mesuré l'activité NK chez des lymphocytes exposés au préalable au LTB₄. Ces derniers répondent à des concentrations 100 fois plus faibles d'IL-2 que ceux qui ne sont pas traités au LTB₄. Ceci montre bien que les cellules NK deviennent plus sensibles à IL-2 lorsqu'elles sont prétraitées au LTB₄.

A la suite de ces résultats nous avons décidé d'étudier l'effet du LTB₄ sur l'expression de la chaîne β du récepteur de IL-2, celle qui est reconnue pour être impliquée dans la cytotoxicité induite par l'IL-2. (Siegel et coll., 1987; Tsudo et coll., 1987; Umehara et coll., 1990)

Le récepteur de l'IL-2 est composé de trois chaînes peptidiques principales appelées α , β et γ . A l'aide d'anticorps spécifiques, différents groupes ont démontré la distribution d'expression des chaînes α et β . La chaîne α n'est exprimée sur aucune cellule au repos, sauf à un faible niveau sur les lymphocytes B et CD4⁺(Ohashi et coll., 1989). La chaîne β , par contre, est exprimée constitutivement sur certaines cellules à des niveaux d'expression différents. Ce sont les cellules CD56⁺(NK) qui possèdent le niveau de base le plus élevé. On en retrouve

également sur les cellules $CD8^+$, $CD14^+$ (monocytes) et très peu chez les cellules $CD4^+$. (Ohashi et coll., 1989).

Nos résultats confirment cette distribution et montrent aussi que chez les lymphocytes préincubés au LTB_4 pendant 24h, il y a une augmentation d'expression du $IL2R\beta$, comparable à celle observée en présence d'un mitogène (Atluru et coll., 1990). Si on sépare les lymphocytes en sous-populations, on observe que les cellules $CD56^+$ présentent une plus grande augmentation, suivies par les cellules $CD8^+$, alors que les cellules $CD4^+$ n'en présentent pas. Ceci montre qu'il y a une augmentation d'expression seulement chez les cellules qui exprimaient $IL2R\beta$ de façon constitutive.

A l'opposé, l' $IL-4$ inhibe l'expression du $IL2R\beta$ tant chez les lymphocytes que chez les monocytes. C'est la première fois que l'on démontre un pouvoir modulateur négatif de l' $IL-4$ sur l'expression du $IL2R\beta$ chez les monocytes. Par contre, Martinez et coll.(1990) ont démontré que l' $IL-4$ inhibait l'expression du récepteur de $IL-2$ sur les lymphocytes. De plus on sait que l' $IL-4$ inhibe l'activité cytotoxique des cellules NK et des monocytes (Vitté-Mony et coll., 1990; Hudson et coll., 1990). Le mécanisme d'action de l' $IL-4$ n'est pas encore bien connu.

Comme l'expression de la protéine IL2R β est augmentée par le LTB $_4$, il était important de vérifier si l'ARNm du IL2R β était modulé par le LTB $_4$. Nos résultats démontrent pour la première fois que le LTB $_4$ stimule l'accumulation de l'ARNm du IL2R β . On observe une augmentation du double du niveau de base de l'ARNm du IL2R β chez les lymphocytes en présence de LTB $_4$. Il y a donc une bonne corrélation entre l'augmentation du message du IL2R β et l'augmentation de la protéine à la surface des lymphocytes humains. Dans des études ultérieures, il serait intéressant de vérifier si le LTB $_4$ affecte la transcription, la stabilité des ARNm ,etc ... Si on compare l'effet du LTB $_4$ à celui d'un stimulus mitogénique comme la PHA, on s'aperçoit qu'il est du même ordre. Il est bien établi que la PHA augmente l'ARNm des deux chaînes, et que le niveau d'induction pour IL2R β est de 2.5 à 4 fois. (Hatakeyama et coll., 1989; Audrain et coll., 1991). Dans notre laboratoire, des études préliminaires ont démontré que le LTB $_4$ n'augmente pas l'expression de IL2R α chez les lymphocytes périphériques humains.

Pour résumer l'effet du LTB $_4$ sur l'induction de la cytotoxicité des cellules NK par l'IL-2, on propose une voie d'activation illustrée à la fig. 16. Premièrement le LTB $_4$ augmente rapidement l'expression d'ARNm du IL2R β chez des lymphocytes humains. Ceci entraîne une augmentation d'expression du IL2R β à la surface de ces cellules. Si on mesure l'activité NK stimulée par IL-2 dans des lymphocytes

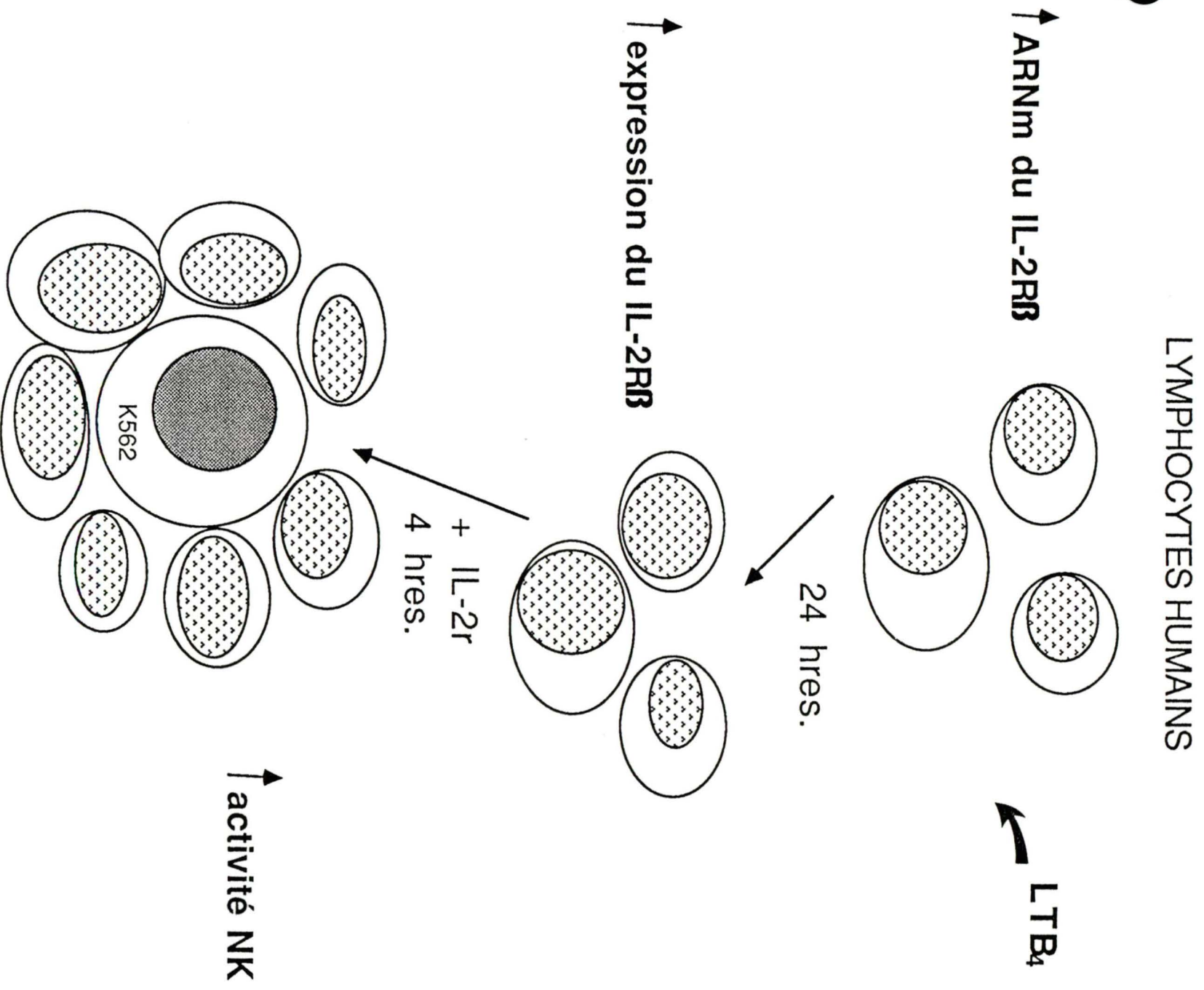


Fig. 16 Voie d'activation des lymphocytes humains traités au LTB $_4$

prétraités au LTB_4 , on remarque que ceux-ci répondent mieux et à des concentrations plus faibles d'IL-2 que les témoins. Les lymphocytes (surtout CD56^+) deviennent donc plus sensibles à l'IL-2 en présence de LTB_4 ; ceci peut s'expliquer par le fait qu'il y a plus de récepteurs de IL-2 qui soient disponibles.

Il a été démontré par plusieurs que l'activité cytotoxique médiée par IL-2 chez les cellules NK se fait via $\text{IL2R}\beta$. Notre étude appuie cette affirmation et montre de plus que le LTB_4 est un modulateur positif de l'expression de $\text{IL2R}\beta$ chez les lymphocytes et les monocytes.

Les monocytes traités au LTB_4 montrent une augmentation d'expression du $\text{IL2R}\beta$ de la même façon que les lymphocytes stimulés par LTB_4 . L'augmentation d'expression du $\text{IL2R}\beta$ chez les monocytes est cependant de plus longue durée que celle observé chez les lymphocytes. Après 48h, l'augmentation du $\text{IL2R}\beta$ chez les monocytes est aussi importante qu'à 24h, alors qu'on ne voit plus d'augmentation chez les lymphocytes. IL est intéressant d'observer que la PHA augmente également $\text{IL2R}\beta$ à la surface des monocytes. Chez les monocytes, nous n'avons pas fait une étude plus approfondie; par contre, certains résultats non publiés de notre laboratoire démontrent que le LTB_4 influence la sécrétion du $\text{TNF}\alpha$ qui est impliquée dans la cytotoxicité

des monocytes. Il serait donc intéressant de poursuivre ces études et de faire la corrélation entre l'augmentation du TNF α et l'augmentation du IL2R β chez des monocytes traités au LTB $_4$.

Dans les réactions allergiques, le LTB $_4$ est depuis plusieurs années reconnu comme étant responsable de plusieurs activités biologiques (neutropénie, production de cytokines, augmentation de l'activité NK) . Plusieurs travaux suggèrent que le LTB $_4$ jouerait un rôle important dans les interactions entre les phénomènes inflammatoires et immunologiques. L'augmentation de la cytotoxicité des cellules NK par IL-2, suite à une amorce par LTB $_4$, est un exemple d'interactions qui peuvent exister.

Comme le CD23 est le récepteur de faible affinité des IgE, et que celui-ci est exprimé sur diverses cellules immunitaires, il était donc intéressant d'étudier le pouvoir modulateur de LTB $_4$ sur le CD23. Ce dernier peut être induit chez les monocytes humains par IL-4 et est exprimé de façon constitutive sur une lignée promyélomonocytaire humaine, les U937 (env. 30% de cellules CD23 $^+$)

Chez les monocytes humains, on ne voit aucun effet modulateur du LTB $_4$ sur l'expression de CD23, ceci même après 72h d'incubation. On voit par contre, dans les mêmes

conditions, une augmentation d'expression du IL2R β sur les monocytes. De plus, l'IL-4 augmente l'expression du CD23 sur les monocytes, alors qu'il diminue leur expression du IL2R β . Ceci montre que les effets modulateurs d'une substance sur une même cellule peuvent être très différents selon le récepteur étudié.

Parallèlement à ces expériences, nous avons également vérifié si le PAF pouvait moduler l'expression du CD23. Nous avons fait cette étude, car de la même façon que le LTB $_4$, le PAF est un médiateur lipidique très important dans les manifestations allergiques. On obtient aucun effet du PAF comme le LTB $_4$ sur l'expression de CD23.

Contrairement à nos résultats, l'équipe de Dugas a démontré que le PAF pouvait augmenter l'expression du CD23 chez les monocytes humains (Paul-Eugène et coll., 1990). Si on compare notre méthodologie avec la leur, il y a quelques différences. Ils ont purifié les monocytes sur des pétris de plastique alors que nous utilisons une couche de fibronectine. Ils stimulent leurs cellules dans des plaques de 24 puits alors que nous utilisons des tubes de 3 ml. Enfin, leur source d'anticorps anti-CD23 est différente de la nôtre. Ils rapportent une augmentation de CD23 par le PAF qui est comparable à celle obtenue avec IL-4. De notre part, nous obtenons une augmentation avec IL-4 et absolument rien avec le PAF. Comme nos cellules répondent à IL-4 de la

même façon que les leurs, on peut présumer que nos conditions de culture sont comparable. On ne peut expliquer la différence qui existe entre nos résultats et les leurs.

Chez les cellules U937, on n'obtient aucun effet modulateur avec le LTB₄ sur l'expression du CD23. Ces résultats sont comparables avec ceux des monocytes humains. On obtient des résultats similaires avec le PAF. Le groupe de Tanaka a démontré que chez les cellules U937, le PAF est un puissant modulateur positif sur l'expression du CD23 (Tanaka et coll., 1989). Après plusieurs essais nous n'avons jamais pu reproduire ces résultats. Pourtant on obtient, comme eux, une augmentation d'expression de CD23 avec l'IL-4 et IFN γ . Notre source du PAF n'est pas la même que celle du Dr Tanaka, mais donne de bons résultats dans d'autres systèmes. On ne peut expliquer la différence qui existe entre nos résultats et les leurs.

Les résultats obtenus avec IL-4 et IFN γ chez les monocytes humains et les cellules U937 sont comparables avec ceux de plusieurs groupes (Vercelli et coll., 1988; Delespesse et coll., 1989; Tanaka et coll., 1989). On sait que l'IL-4 augmente l'expression du CD23 sur plusieurs types cellulaires dont, entre autres, les lymphocytes B, les monocytes et les cellules U937. Par contre l'IFN γ supprime l'effet du IL-4 chez les lymphocytes B (Defrance et coll., 1987) mais pas chez les monocytes et les cellules U937

(Vercelli et coll., 1988; Tanaka et coll., 1989). On croit donc que l'effet suppresseur de IFN γ sur IL-4 est spécifique au lymphocyte B.

L'IFN γ n'augmente pas l'expression du CD23 chez les monocytes comparativement aux cellules U937 où l'expression est augmentée de la même façon que peut le faire IL-4. De plus il n'existe aucun effet synergique entre l'IFN γ et IL-4 chez les cellules U937. La différence de résultats entre les monocytes et les U937 est probablement due au stade de différenciation des cellules. On sait que l'expression du CD23 est variable selon le type cellulaire et le stade de différenciation.

CONCLUSIONS

Les résultats de notre étude montrent le pouvoir immunorégulateur du LTB_4 sur l'expression de différents récepteurs immunologiques.

Nous avons démontré l'effet du LTB_4 sur l'expression du $\text{IL2R}\beta$ chez les lymphocytes humains. C'est dans la sous-population CD56^+ que l'on voit la meilleure augmentation d'expression du $\text{IL2R}\beta$. Au niveau moléculaire, nous avons démontré que l'accumulation de l'ARNm du $\text{IL2R}\beta$ était augmentée par le LTB_4 . Ceci est comparable à l'effet du mitogène bien connu, la PHA. Comme l' $\text{IL2R}\beta$ est responsable de la cytotoxicité induite par IL-2 dans les cellules NK, l'augmentation de la sensibilité des cellules NK à IL-2 en présence de LTB_4 peut être expliquée par l'augmentation d'expression d' $\text{IL2R}\beta$.

Au niveau fonctionnel, on croit que l'augmentation du $\text{IL2R}\beta$ à la surface des cellules NK permet d'augmenter les chances de liaison avec IL-2. Les cellules NK traitées au LTB_4 répondent à des concentrations moins élevées d'IL-2 que les cellules témoins.

Parallèlement à ces observations, nous avons démontré que le LTB_4 augmentait l'expression du $\text{IL2R}\beta$ chez les monocytes. L'effet du LTB_4 n'est donc pas spécifique aux

lymphocytes. Nous avons remarqué également que l'augmentation du IL2R β par LTB $_4$ se produisait seulement chez les cellules qui au départ exprimait le IL2R β . Les cellules positives, en présence de LTB $_4$, deviennent donc plus positives. On a démontré de plus que, contrairement au LTB $_4$, l'IL-4 diminue l'expression du IL2R β chez les monocytes et les lymphocytes. Le mécanisme d'action exact de l'IL-4 n'est pas encore clair. Il est connu que IL2R β est impliqué dans la cytotoxicité des monocytes en réponse à l'IL-2. Il est donc très probable que l'augmentation de IL2R β observée chez les monocytes augmente la sensibilité des monocytes à l'IL-2. Des résultats préliminaires obtenus dans notre laboratoire démontrent que des monocytes traités pendant 24h au LTB $_4$, répondent à des concentrations plus faible d'IL-2 en production de TNF.

Tout à l'opposé du IL2R β , le récepteur de faible affinité pour les IgE (CD23) n'est aucunement modulé par le LTB $_4$ chez les monocytes. Ceux-ci n'expriment pas le CD23 au départ mais peuvent être induits à l'exprimer, entre autre par IL-4. Il est intéressant d'observer que le CD23 n'est pas augmenté par le LTB $_4$ mais, par contre, est augmenté en présence d'IL-4. D'autre part, IL2R β est augmenté par le LTB $_4$ mais diminué par IL-4.

Suite à ces observations, nous avons comparé l'effet du LTB $_4$ à celui du PAF sur l'expression du CD23. Nous avons

remarqué que de la même façon que le LTB_4 , le PAF n'a aucun effet modulateur sur le CD23 chez les monocytes. Nous avons refait les mêmes expériences sur la lignée cellulaire U937 qui exprime le CD23 de façon constitutive et qui n'est pas au même stade de différenciation que les monocytes. Nous avons obtenu les mêmes résultats pour le LTB_4 et le PAF. Par contre lorsque l'on stimule les monocytes et les cellules U937 avec de l'IFN γ , on trouve une différence dans les résultats. L'IFN γ n'augmente pas l'expression de CD23 chez les monocytes humains, tandis que chez les cellules U937, l'IFN γ augmente le CD23 de la même façon que l'IL-4. Ces divergences peuvent s'expliquer par le fait que le stade de différenciation des cellules soit différent.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier spécialement le docteur Marek Rola-Pleszczynski dont les judicieux conseils et la confiance m'ont aidée à mener à bien ce travail

Je voudrais également exprimer ma reconnaissance aux membres du laboratoire d'immunologie. Tout paticulièrement à Sylvie Turcotte, Denis Gingras, Diane Bolduc et Louise Bouvrette pour leur disponibilité et leur support moral.

Je ne voudrais pas passer sous silence les encouragements constants de mes amis et de mon conjoint Alain Fortier.

Finalement je remercie Lucie Laliberté pour la dactylographie de ce document.

RÉFÉRENCES

1. Abbud-Fiho, M., B.J. Ransil, V.E. Kelley, W. Fiers, et T.B. Strom. (1986). Natural killer cell response to interferons. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 39:264-276.
- 1a. Abbas, A.K., A.H. Lichtman, et J.S. Pober. *Cellular and molecular immunology*, M.L. Wonsiewicz, Philadelphia. (1991). pp 417.
2. Albert, D.H., et F. Snyder. (1983). Biosynthesis of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (platelet-activating factor) from 1-alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine by rat alveolar macrophages. *J. Biol. Chem.* 258:97-102.
3. Anderson, C.L., et H.L. Spiegelberg. (1981). Macrophage receptors for IgE: binding of IgE to specific IgE Fc receptors on a human macrophage cell line, U937. *J. Immunol.* 126:2470-2473.
4. Asao, H., T. Takeshita, M. Nakamura, K. Nagata, et K. Sugamura. (1990). Interleukin 2(IL-2)-induced tyrosine phosphorylation of IL-2 receptor p75. *J. Exp. Med.* 171:637-644.
5. Atluru, D., S. Polam, S. Atluru, et G.E. Wolaschak. (1990). Regulation of Mitogen-stimulated Human T-cell proliferation, interleukin 2 receptor: Expression by Protein Kinase Inhibitor, H-7. *Cell. Immunol.* 129:310-320.
6. Audrain, M., F. Boeffard, J.-P. Souillou, et Y. Jacques. (1991). Synergistic action of monoclonal antibodies directed at p55 and p75 chains of the human IL-2 receptor. *J. Immunol.* 146:884-892.
7. Bauer, J., U. Ganter, T. Geiger, U. Jacobshagen, T. Hirano, T. Matsuda, T. Kishimoto, T. Andus, G. Acs, W. Gerok, et G. Ciliberto. (1988). Regulation of interleukin-6 expression in cultured human blood monocytes and monocyte-derived macrophages. *Blood* 72:1134-1140.
8. Becker, S., et E.G. Daniel. (1990). Antagonistic and additive effects of IL-4 and interferon on human monocytes and macrophages: effects on Fc Receptors, HLA-D antigens, and superoxide production. *Cell. Immunol.* 129:351-362.
9. Benveniste, J., P.M. Henson, et C.G. Cochrane. (1972). Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils and a platelet-activating factor. *J. Exp. Med.* 136:1356-1377.
10. Benveniste, J., M. Tence, P. Varenne, J. Bidault, C. Boullet, et J. Polensky. (1979). Semisynthèse et structure proposée du facteur activant les plaquettes (PAF): PAF-acether, un alkyl ether analogue de la lysophosphatidylcholine. *Compt. Rend. Acad. Sci.* 289D:1037-1042.
11. Blank, M.L., T.C. Lee, V. Fitzgerald, et F. Snyder. (1981). A specific acetylhydrolase for 1-alkyl-2 acetyl-sn-glycero-phosphocholine (a hypotensive and platelet activating lipid). *J. Biol. Chem.* 256:175-178.

12. Bloom, E.T., J.T. Babbitt, et K. Kawakami. (1986). Monocyte mediated augmentation of human natural killer cell activity: conditions, monocyte and effector cell characteristics. *J. Immunol.* 137:172-178.
13. Borgeat, P., M. Nadeau, H. Salari, P. Poubelle, et B. Fruteau. (1985). Leukotrienes: Biosynthesis, Metabolism and Analysis. *Adv. Lipid Res.* 21:47-73.
14. Borgeat, P., et B. Samuelsson. (1979a). Transformation of arachidonic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes formation of a novel dihydro-eicosa-tetranoic acid. *J. Biol. Chem.* 254:2643-2646.
15. Borgeat, P., et B. Samuelsson. (1979b). Metabolism of arachidonic acid in polymorphonuclear leucocyte: unstable intermediate in formation of dihydroxyacids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:2148-2152.
16. Braquet, P., et M. Rola-Pleszczynski. (1987). The role of PAF in immunological responses. *Immunol. Today* 8:345-352.
17. Braquet, P., L. Touqui, T.Y. Shen, et B.B. Vargaftig. (1987). Perspectives in platelet-activating factor research. *Pharmacol. Rev.* 39:97-145.
18. Beutler, B., et A. Cerami. (1987). Cachectin: More than a tumor necrosis factor. *New Engl. J. Med.* 316:379-385.
19. Camussi, G., T. Pawlowski, C. Tetta, C. Raffinello, M. Alberton, J. Brenjeins, et G. Andres. (1983). Acute lung inflammation induced in the rabbit by local installation of 1-O-octadecyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphocholine or of native platelet-activating factor. *Am. J. Pathol.* 112:78-88.
20. Capron, A., J.P. Dessaint, M. Capron, et H. Bazin. (1975). Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to *Schistosoma mansoni* schistosomules. *Nature* 253:474-475.
21. Capron, M., A. Capron, J.P. Dessaint, G. Torpier, S.G. Johansson, et L. Prin. (1981). Fc receptor for IgE on human and rat eosinophils. *J. Immunol.* 126:2087-2092.
22. Capron, M., M.D. Kazatchkine, E. Fischer, M. Joseph, A.E. Butterworth, J.P. Kusnierz, L. Prin, J.P. Papin, et A. Capron. (1987). Functional role of the alpha-chain of complement receptor type 3 in human eosinophil-dependent antibody-mediated cytotoxicity against schistosomes. *J. Immunol.* 139:2059-2065.
23. Chignard, M., J.P. LeCouedic, B.B. Vargaftig, et J. Benveniste. (1980). Platelet-activating (PAF-acether) secretion from platelets: Effects of aggregating agents. *Br. J. Haematol.* 46:455-464.
24. Chilton, F.H., J.T. O'Flaherty, C.E. Walsh, M.J. Thomas, R.L. Wykle, L.R. DeChatelet, et B.M. Waite. (1982). Stimulation of the lipoxygenase pathway in polymorphonuclear leukocytes by 1-O-alkyl-2-O-acetyl-SN-glycerol-3-phosphocholine. *J. Biol. Chem.* 257:5402-5407.

25. Chomczynski, P., et N. Sacchi. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
26. Cosman, D., D.P. Cerretti, A. Larsen, L. Park, C. March, S. Dower, S. Gillis, et D. Urdal. (1984). Cloning, sequence and expression of human interleukin-2 receptor. *Nature* 312:768-771.
27. De Velde, A.A., J.B.G. Xlomp, B.A. Yard, J.B. DeVries, et C.G. Frigdor. (1988). Modulation of phenotypic and functional properties of human peripheral blood monocytes by IL-4. *J. Immunol.* 140:1548-1554.
28. Defrance, T., J.P. Aubry, F. Rousset, B. Vanbervliet, J.Y. Bonnefoy, N. Arai, Y. Takebe, T. Yokota, F. Lee, et K. Arai. (1987). Human recombinant interleukin 4 induces Fc epsilon receptors (CD23) on normal human B lymphocytes. *J. Exp. Med* 165: 1459-1467.
29. Delespesse, G., M. Sarfati, M. Rubio-Trujillo, et T. Wolowiec. (1986a). IgE receptors on human lymphocytes. II. Detection of cells bearing IgE receptors in unstimulated mononuclear cells by means of a monoclonal antibody. *Eur. J. Immunol.* 16:815-821.
30. Delespesse, G., M. Sarfati, M. Rubio-Trujillo, et T. Wolowiec. (1986b). IgE receptors on human lymphocytes. III. Expression of IgE receptors on mitogen-stimulated human mononuclear cells. *Eur. J. Immunol.* 16:1043-1047.
31. Demopoulos, C.A., R.N. Pinckard, et D.J. Hanahan. (1979). Platelet-activating-factor: evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediator). *J. Biol. Chem.* 254:9355-9358.
32. Dempsey, R.A., C.A. Dinarello, J.W. Mier, L.J. Rosenwasser, M. Allegretta, T.E. Brown, et D.R. Parkinson. (1982). The differential effects of human leukocytic pyrogen/lymphocyte-activating factor, T cell growth factor, and interferon on human natural killer activity. *J. Immunol.* 129:2504-2510.
33. Dubois, C., E. Bissonnette, et M. Rola-Pleszczynski. (1989). Platelet-activating-factor (PAF) enhances tumor necrosis factor production by alveolar macrophages: Prevention by PAF receptor antagonists and lipoxygenase inhibitors. *J. Immunol.* 143:964-970.
34. Espinoza-Delgado, I., J.R. Ortaldo, R. Winkler-Pickett, K. Sugamura, L. Varesio, et D.L. Longo. (1990). Expression and role of p75 interleukin 2 receptor on human monocytes. *J. Exp. Med.* 171:1821-1826.
35. Farrar, J.J., W.R. Benjamin, M.L. Hilfiker, M. Howard, W.L. Farrar, et J. Fuller-Farrar. (1982). The biochemistry biology, and role of interleukin 2 in the induction of cytotoxic T cell and antibody-forming B cell responses. *Immunol. Rev.* 63:129-166.
36. Farrar, J.J., P.L. Simon, W.J. Koopman, et J. Fuller-Bonar. (1978). Biochemical relationship of thymocyte mitogenic factors and factors enhancing humoral and cell mediated immune responses. *J. Immunol.* 121:1353-1360.

37. Fels, A.O., N.A. Pawlowski, E.B. Cramer, T.K. King, A.Z. Cohen, et W.A. Scott. (1982). Human alveolar macrophages produce leukotriene B₄. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:7866-7870.
38. Fitzgerald, P.A., R. Evans, D. Kirkpatrick, et C. Lopez. (1983). Heterogeneity of human NK cells: comparison of effectors that lyse HSV-1-infected fibroblast and K562 erythroleukemia targets. *J. Immunol.* 130:1663-1667.
39. Gonzalez-Molina, A., et H.L. Spiegelberg. (1977). A subpopulation of normal human peripheral B lymphocytes that bind IgE. *J. Clin. Invest.* 59:616-624.
40. Greene, W.C., R.J. Robb, P.B. Svetlek, C.M. Rusk, L. Depper, et W. J. Leonard. (1985). Stable expression of cDNA encoding the human interleukin 2 receptor in eukaryotic cells. *J. Exp. Med.* 162:363-368.
41. Haliotis, T., J.K. Ball, D. Dexter, et J.C. Roder. (1985). Spontaneous and induced primary oncogenesis in natural killer (NK)-cell-deficient beige mutant mice. *Int. J. Cancer* 35:505-513.
42. Hartung, H.P. (1983). Acetyl glyceryl ether phosphorylcholine(platelet-activating factor) mediates heightened metabolism activity in macrophages. Studies on PGE₂, TXB₂ and O₂-production, spreading, and the influence of calmoduline-inhibitor W-7. *FEBS Lett.* 160:209-212.
43. Hatakeyama, M., M. Tsudo, S. Minamoto, T. Kono, T. Doi, T. Miyata, M. Miyasaka, et T. Taniguchi. (1989). Interleukin 2 receptor β chain gene: generation of three receptor forms by cloned human α and β chain cDNAs. *Science* 244:551-556.
44. Henney, C.S., K. Kuribayashi, D.E. Kern, et S. Gillis. (1981). Interleukin-2 augments natural killer cell activity. *Nature* 291:335-338.
45. Herberman, R.B., et J.R. Ortaldo. (1981). Natural killer cells: their role in defenses against disease. *Science* 214:24-30.
46. Herrmann, F., S.A. Cannistra, H. Levine, et J.D. Griffin. (1985). Expression of interleukin 2 receptor and binding of interleukin 2 by γ interferon-induced human leukemic cells and normal monocytic cells. *J. Exp. Med.* 162:1111-1116.
47. Heymans, F., E. Michel, M. Borrel, B. Wichowski, J. Godfroid, O. Convert, E. Coeffer, M. Tence, et J. Benveniste. (1981). New total synthesis and high resolution ¹H NMR spectrum of platelet-activating factor, its enantiomer and racemic mixtures. *Biochim. Biophys. Acta* 666:230-237.
48. Ho, Y.-S., W.M.F. Lee, et R. Snydermann. (1987). Chemoattractant-induced activation of c-fos gene expression in human monocytes. *J. Exp. Med.* 165:1524-1538.
49. Honda, M., K. Kitamura, T. Takeshita, K. Sugamura, et T. Tokunaga. (1990). Identification of a soluble IL-2 receptor β -chain from human lymphoid cell line Cells. *J. Immunol.* 145:4131-4135.

50. Houslay, M.D., D. Bojanic, et A. Wilson. (1986). Platelet-activating factor and U44069 stimulate a GTPase active in human platelets which is distinct from the guanine nucleotide regulate proteins Ns and Ni. *Biochem. J.* 234:737-740.
51. Hudson, M.M, A.B. Markowitz, J.U. Gutterman, R.D.Knowles, J.S. Snyder, et E.I. Kleinerman. (1990). Effect of recombinant human interleukin 4 on human monocyte activity. *Cancer Res.* 50:3154-3158.
52. Hwang, S.-B., M.-H. Lam, et S.S. Pong. (1986). Ionic and GTP regulation of binding of platelet-activating factor to receptors and platelet-activating factor-induced activation of GTPase in rabbit platelet membranes. *J. Biol. Chem.* 261:532-537.
53. Hwang, S.B. (1988). Identification of a second putative receptor of platelet-activating factor from human polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* 263:3225-3233.
54. Hwang, S.B., M.H. Lam, et T.Y. Shen. (1985). Specific binding sites for platelet-activating factor in human lung tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128:972-979.
55. Ieyasu, H., Y. Takai, K. Kaibuchi, M. Sawamura, et Y.Nishizuka. (1982). A role of calcium-activated phospholipid-dependent protein kinase in platelet-activating factor-induced serotonin release from rabbit platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 108:108-1701.
56. Ikuta, K., M. Takami, C.W. Kim, T. Honjo, T. Miyoshi, Y. Tagaya, T. Kawabe, et J. Yodoi. (1987). Human lymphocyte Fc receptor for IgE: sequence homology of its cloned cDNA with animal lectins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:819-823.
57. Joseph, M., C. Auriault, A. Capron, H. Vorng, et P. Viens. (1983). A new function for platelets: IgE-dependent killing of schistosomes. *Nature* 303:810-812.
58. Joseph, M., A. Capron, J.C. Ameisen, M. Capron, H. Vorng, V. Pancrerie, J.P. Kusnierz, et C. Auriault (1986). The receptor for IgE on blood platelets. *Eur. J. Immunol.* 16:306-312.
59. Kikutani, H., S. Iniu, R. Sato, E.L. Barsumian, H. Owaki, K. Yamazaki, T. Kaisho, N. Ushibayashi, R.R. Hardy, T. Hirano, S. Tsunasawa, F. Sakiyama, M. Suemura, et T. Kishimoto. (1986a). Molecular structure of human lymphocyte receptor for immunoglobine E. *Cell* 47:657-662.
60. Kikutani, H., M. Suemura, H. Owaki, H. Nakamura, R. Sato, K. Yamasaki, E.L. Barsumian, R.R Hardy, et T. Kishimoto. (1986b). Fc epsilon receptor a specific differentiation marker transiently expressed on mature B cells before isotype switching. *J. Exp. Med.* 164:1455-1496.
61. Lapetina, E.G. (1982). Platelet-activating factor stimulates the phosphatidylinositol cycle: appearance of phosphatidic acid is associated with the release of serotonin in horse platelets. *J. Biol. Chem.* 257:7314-7317.
62. Lartique-Mattei, C., D. Godeneche, J.L. Chabard, J. Petit, et J.A. Bignol. (1984). Pharmacokinetic study of 3H-labelled lyso-PAF-acether after intravenous administration in the rabbit and protein binding. *Agents Action.* 15:643-648.

63. Le, J, et J. Vilak. (1987). Tumor necrosis factor and interleukin 1: cytokines with multiple over lapping biological activities. *Lab. Invest.* 56:234-248.
64. Lee, J.S., R.C. Ong, T.J. Yoo, et T.M. Chiang. (1990). Binding of platelet-activating factor by isolated membranes from U937 cells. *Cell. Immunol.* 125:415-425.
65. Lee, T.C., B. Malone, S.I. Wasserman, V. Fitzgerald, et F. Snyder. (1982). Activities of e n z y m e s t h a t m e t a b o l i z e p l a t e l e t - a c t i v a t i n g factor(1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) in neutrophils and eosinophils from human and the effect of calcium ionophore. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 105:1303-1308.
66. Leonard, W.L., J.M. Depper, G.R. Crabtree, S. Rudakoff, J. Pumphrey, R.J. Robb, M. Krônke, P.B. Svetlik, N.J. Pfeffer, T.A. Waldmann, et W.C. Greene. (1984). Molecular cloning and expression of cDNAs for the human interleukin 2 receptor. *Nature* 311:626-631.
67. Lotzova, E., et R.B. Herberman. (1986). Immuno biology of natural killer cells.(Vol I & II) CRC Press: Floride. pp 215.
68. Ludin, C., H. Hofstetter, M. Sarfati, C.A. Levy, U. Suter, D. Alaimo, E. Kilchherr, H. Frost, et G. Delespesse. (1987). Cloning and expression of the cDNA coding for a human Lymphocyte IgE receptor. *EMBO J.* 6:109-114.
69. Luger, T.A., J. Krutmann, R. Kirnbauer, A. Urbanski, T. Schwarz, G. Klappacher, A. Kock, M. Micksche, J. Malejczyk, L. Schauer, L.T. May, et P.B. Sehgal. (1989). IFN-beta 2/IL-6 augments the activity of human natural killer cells. *J. Immunol.* 143:1206-1209.
70. Lynch, J.M., G.Z. Lotner, S.J. Betz, et P.M. Henson. (1979). The release of a platelet-activating factor by stimulated rabbit neutrophils. *J. Immunol.* 123:1219-1226.
71. Malkovsky, M., B. Loveland, M. North, G.I. Asherson, L. Gao, et P. Ward. (1987). Recombinant interleukin-2 directly augments the cytotoxicity of human monocytes. *Nature* 325:262-265.
72. Martinez, O.M., S.R. Gibbons, M.R. Garovoy, et R.F. Arenson. (1990). IL-4-inhibits IL-2 receptor expression and IL-2-dependent proliferation of human T cells. *J. Immunol.* 144:2211-2215.
73. Melewicz, F.M., L.E. Kline, A.B. Cohen, et H.L. Spiegelberg. (1982b). Characterization of Fc receptors for IgE on human alveolar macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 49:364-370.
74. Melewicz, F.M., J.M. Plummer, et H.L. Spiegelberg. (1982a). Comparison of the Fc receptors for IgE on human lymphocytes and monocytes. *J. Immunol.* 129:563-569.
75. Melewicz, F.M., et H.L. Spiegelberg. (1980). Fc receptors for IgE on a subpopulation of human peripheral blood monocytes. *J. Immunol.* 125:1026-1031.

76. Melewicz, F.M., R.S. Zeiger, M.H. Mellon, R.D. O'Connor, et H.L. Spiegelberg. (1981). Increased IgE-dependent cytotoxicity by blood mononuclear cells of allergic patients. *Clin. Exp. Immunol.* 43:526-533.
77. Metzger, H. (1988). Molecular aspects of receptors and binding factors for IgE. *Adv. Immunol.* 43:277-312.
78. Meuer, S.C., R.E. Hussey, D.A. Cantrell, J.C. Hodgden, S.F. Schlessman, K.A. Smith, et E.L. Reinherz. (1984). Triggering of the T3-Ti antigen receptor complex results in clonal T cell proliferation through an interleukin 2 dependent autocrine pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1509-1513.
79. Miller, D.K., J.W. Gillard, P.J. Vickers, S. Sadowski, C. Leveille, J.A. Mancini, P. Charleson, R.A.F. Dixon, A.W. Ford-Hutchinson, R. Fortin, J.Y. Gauthier, J. Rodkey, R. Rosen, C. Rouzer, I.S. Sigal, C.D. Strader, et J.F. Evans. (1990). Identification and isolation of a membrane protein necessary for leukotriene production. *Nature* 343:278-281.
80. Mills, G.B., C. May, M. McGill, M. Fung, M. Baker, R. Sutherland, et W.C. Greene. (1990). Interleukin 2-induced tyrosine phosphorylation. Interleukin 2 receptor β is tyrosine phosphorylated. *J. Biol. Chem.* 265:3561-3567.
81. Nakamura, M., Z.I. Honda, T. Izumi, C. Sakanaka, H. Mutoh, M. Minami, H. Bito, Y. Seyama, T. Mutsumoto, M. Noma, et T. Shimizu. (1991). Molecular cloning and expression of platelet-activating factor receptor from human leukocytes. *J. Biol. Chem.* 266:20400-20403.
82. Nikaido, T., A. Shimizu, N. Ishida, H. Sabe, K. Teshigawara, M. Maeda, T. Uchiyama, J. Yodoi, et J. Honjo. (1984). Molecular cloning of cDNA encoding human interleukin-2 receptor. *Nature* 311:631-635.
83. O'Flaherty, J.T., M.J. Thomas, M.J. Hammette, C. Carroll, et C.E. McCall. (1983). 5-L-Hydroxy-6,8,11,14-eicosatetraenoate potentiates the human neutrophil degranulating action of platelet-activating factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 111:1-7.
84. Ortaldo, J.R., R.K. Oldham, G.C. Cannon, et R.B. Herberman. (1977). Specificity of natural cytotoxic reactivity of normal human lymphocytes against a myeloid leukemia cell line. *J. Natl. Cancer Inst.* 59:77-83.
85. Ostenson, M.E., D.L. Thiele, et P.E. Lipsky. (1987). Tumor necrosis factor α enhances cytolytic activity of human natural killer cells. *J. Immunol.* 138:4185-4191.
86. Ohashi, Y., T. Takeshita, K. Nabata, S. Mori, et K. Sugamura. (1989). Differential expression of the IL-2 receptor subunits, p55 and p75 on various populations of primary peripheral blood mononuclear cells. *J. Immunol.* 143:3548-3555.
87. Paul-Eugene, N., B. Dugas, S. Picquot, V. Lagente, J.-M. Mencia-Huerta, et P. Braquet. (1990). Influence of interleukin-4 and platelet-activating factor on the Fc ϵ R11/CD23 expression on human monocytes. *J. Lipid Mediat.* 2:95-101.

88. Peplow, P.V., et D.P. Milkhailedis. (1990). Platelet-activating factor (PAF) and its relation to prostaglandins, leukotrienes and other aspects of arachidonate metabolism. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fatty Acids* 41:71-82.
89. Phillips, J.H., T. Takeshita, K. Sugamura, et L.L. Lanier. (1989). Activation of natural killer cells via the p75 interleukin-2 receptor. *J. Exp. Med.* 170:291-296.
90. Pignol, B., S. Helane, J.-M. Mencia-Huerta, M. Rola-Pleszczynski, et P. Braquet. (1987). Effect of platelet-activating factor(PAF-acether) and its specific receptor antagonist BN52021, on interleukin 1 (IL-1) release and synthesis by rat spleen adherent monocyte. *Prostaglandins* 33:931-939.
91. Pross, H.F., M.G. Baines, P. Rubin, P. Shragge, et M.S. Patterson. (1981). Spontaneous human lymphocyte-mediated-cytotoxicity against tumor target cells. IX. The quantification of natural killer cell activity. *J. Clin. Immunol.* 1:51-57.
92. Rankin, J.A. (1986). IgE immune complexes induce leukotriene B₄ release from rat alveolar macrophages. *Ann. Inst. Pasteur Immunol.* 137c:364-367.
93. Robb, R.J., et R.M. Kutny. (1987). Struture-function relationship for the IL-2 receptor system.IV. Analysis of the sequence and ligand binding properties of soluble Tac protein. *J. Immunol.* 139:855-862.
94. Robb, R.J., A. Munck, et K.A. Smith. (1981). T cell growth factor receptors. Quantification, specificity and biological relevance. *J. Exp. Med.* 154:1455-1474.
95. Rola-Pleszczynski, M., P.-A. Chavaillaz, et I. Lemaire. (1986). Stimulation of interleukin 2 and interferon-gamma production by leukotriene B₄ and human lymphocyte culture. *Prostagl. Leukotr. Med.* 23:207-210.
96. Rola-Pleszczynski, M., L. Gagnon, et P. Sirois. (1983). Leukotriene B₄ augments human natural cytotoxic cell activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 113:531-537.
97. Rola-Pleszczynski, M., et I. Lemaire. (1985). Leukotrienes augment interleukin 1 production by human monocytes. *J. Immunol.* 135:3958-3961.
98. Rola-Pleszczynski, M., B. Pignol, C. Pouliot, et P. Braquet. (1987). Inhibition of human lymphocyte proliferation and interleukin 2 production by platelet-activating factor(PAF-acether): reversal by a specific antagonist, BN52021. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142:754-760.
99. Rola-Pleszczynski, M., C. Pouliot, S. Turcotte, B. Pignol, et P. Braquet. (1988). Immune regulation by platelet-activating I. Induction of suppressor cell activity in human monocytes and CD8+ T cells. *J. Immunol.* 140:3547-3552.
100. Rouzer, C.A., A.W. Ford-Hutchinson, H.E. Morton, et J.W. Gillard. (1990). MK866,a potent and specific leukotriene biosynthesis inhibitor blocks and reverses the membrane association of 5-lipoxygenase in ionophore-challenged leukocytes. *J. Immunol.* 265:1436-1442.

101. Rubin, L.A., C.C. Kurman, M.E. Fritz, W.E. Biddison, B. Boutin, R. Yarchoan, et D.L. Nelson. (1985). Soluble interleukin 2 receptors are released from activated human lymphoid cells in vitro. *J. Immunol.* 135:3172-3177.
102. Sabe, H., S. Kondo, A. Shimizu, Y. Tagaya, J. Yodoi, N. Kabayashi, M. Hatanaka, N. Matsunami, M. Noma, et T. Honjo. (1984). Properties of human IL2 receptor expressed on non-lymphoid cells by cDNA transfection. *Mol. Biol. Med.* 2:379-396.
103. Samuelsson, B., P. Borgeat, S. Hammarstrom, et R.C. Murphy. (1979). Introduction of a nomenclature: leukotrienes. *Prostaglandins* 17:785-787.
104. Samuelsson, B., S.-E. Dahlen, J.A. Lindgren, C.A. Rouzer, et C.N. Serhan. (1987). Leukotrienes and Lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science* 237:1171-1176.
105. Sayers, T.J., A.T. Mason, et I.R. Ortaldo. (1986). Regulation of human natural killer cell activity by interferon-gamma: lack of a role in interleukine-2 mediated augmentation. *J. Immunol.* 136:2176-2180.
106. Sharon, M., R.D. Klausner, B.R. Cullen, R. Chizzonite, et W.J. Leonard. (1986). Novel interleukin 2 receptor subunit detected by cross linking under high affinity conditions. *Science* 234:859-863.
107. Shaw, J., V. Monticone, G. Mills, et V. Paetkau. (1978). Effects of costimulator on immune responses in vitro. *J. Immunol.* 120:1974-1980.
108. Siegel, J.P., M. Sharon, P.L. Smith, et W.J. Leonard. (1987). The IL-2 receptor β chain(p70): Role in mediating signals for LAK,NK,and proliferative activities. *Science* 238:75-78.
109. Smith, K.A. (1980). T cell growth factor. *Immunol. Rev.* 51:337-357.
110. Spiegelberg, H.L. (1984). Structure and function of Fc receptors for IgE on lymphocytes, monocytes, and macrophages. *Adv. Immunol* 35:61-88.
111. Spiegelberg, H.L., F.M. Melewicz, et N.R. Ferreri. (1986). IgE Fc receptors on monocytes and allergy. *Ann. Inst. Pasteur Immunol.* 137c:358-363.
112. Takasugi, M., M.R. Mickey, et P.I. Terasaki. (1973). Reactivity of lymphocytes from normalpersons on cultured tumor cells. *Cancer Res.* 33:2898-2902.
113. Takeshita, T., Y. Goto, K. Tada, H. Asao, et K. Sugamura. (1989). Monoclonal antibody defining a molecule possibly identical to the p75 subunit of interleukin 2 receptor. *J. Exp. Med.* 169:1323-1332.
- 113a. Takeshita, T., K. Ohtani, H. Asao, S. Kumaki, M. Nakamura, et K. Sugamura. (1992a). An associated molecule, p64, with IL-2 Receptor β chain. *J. Immunol.* 148:2154-2158.

- 113b Takeshita, T., H. Asao, K. Ohtani, N. Ishii, S. Kumaki, N. Tanaka, H. Munakata, M. Nakamura, et K. Sugamura. (1992b). Cloning of the γ chain of the human IL-2 receptor. *Science*. 257:379-382.
114. Tanaka, M., K. Lee, J. Yodoi, H. Saito, Y. Iwai, K.-M. Kim, M. Morita, M. Mayumi, et H. Mikawa. (1989). Regulation of Fc ϵ receptor 2(CD23) expression on a human eosinophilic cell line EoL3 and a human monocytic cell line U937 by transforming growth factor B. *Cell. Immunol.* 122:96-107.
115. Te Velde , A.A., J.P.G. Klomp, B.A. Yard, J.E. De Vries, et G. Figdor. (1988). Modulation of phenotypic and functional properties of human peripheral blood monocytes by IL-4 . *J. Immunol.* 140:1548-1554.
116. Teshigawara, K., H.-M. Wang, K. Kato, et K.A. Smith. (1987). Interleukin-2 high affinity receptor expression depends on two distinct binding proteins. *J. Exp. Med.* 165:223-238.
117. Timonen, T., J.R. Ortaldo, et R.B. Herberman. (1982). Analysis by a single cell cytotoxicity assay of natural killer (NK) cell frequencies among human large granular lymphocytes and of the effects of interferon on their activity. *J. Immunol.* 128:2514-2521.
118. Timonen, T., A. Ranki, E. Saksela, et P. Hayry. (1979). Human natural cell-mediated cytotoxicity against fetal fibroblasts. III. Morphological and functional characterization of the effector cells. *Cell Immunol.* 48:121-132.
119. Tosato, G., K.B. Seamon, N.D. Goldman, P.B. Sehgal, L.T. May, G.C. Washington, K.D. Jones, et S.E. Pike. (1987). Monocyte-derived human B-cell growth factor identified as interferon- β 2 (BSF-2,IL-6). *Science* 239:502-504.
120. Trinchieri, G., et B. Perussia. (1984). Human natural killer cells: biologic and pathologic aspects. *Lab. Invest.* 50:489-513.
121. Tsudo, M., H. Karasuyama, F. Kitamura, T. Tanaka, S. Kubo, Y. Yamamura, T. Tamatani, M. Hatakeyama, T.M. Taniguchi, et M. Miyasaka. (1990). The IL-2 receptor beta-chain(p70). Ligand ability of the cDNA-encoding membrane and secreted forms. *J. Immunol.* 145:599-606.
122. Tsudo, M., R.W. Kozak, C.R. Goldman, et T.A. Waldmann. (1986). Demonstration of a non-Tac peptide that binds interleukin 2: A potential participant in a multichain interleukin 2 receptor complexe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:9694-9698.
123. Uchiyama, T., S. Broder, et T.A. Waldmann. (1981). A monoclonal antibody (anti-Tac) reactive with activated and functionally mature human T cells.I. Production of anti-Tac monoclonal antibody and distribution of Tac (+) cells. *J. Immunol.* 126:1393-1397.
124. Umehara, H., et E.T. Bloom. (1990). The IL-2 receptor β subunit is absolutely required for mediating the IL-2-induced activation of NK activity and proliferative activity of human large granular lymphocyte. *Immunol.* 70:111-115.
125. Valone, F.H. (1988). Identification of platelet-activating factor receptors in P388D, murine macrophages. *J. Immunol.* 140:2389-2394.

126. Valone, F.H., E. Coles, V.R. Reihold, et E.J. Goetzel. (1982). Specific binding of phospholipide platelet-activating factor by human platelets. *J. Immunol.* 129:1637-1641.
127. Van de Giend, R.J., C.P.M. Ronteltap, C. Gravenkamp, D. Monnikendam, et R.L.H. Bolhuis. (1986). Interferon- β and recombinant IL-2 can both enhance, but by different pathways, the nonspecific cytolytic potential of T3- natural killer cell derived clones rather than that of T3+ clones. *J. Immunol.* 136:1700-1707.
128. Vercelli, D., H.H. Jabara, B.-W. Lee, N. Woodland, R.S. Geha, et D.Y.M. Leung. (1988). Human recombinant interleukin 4 induces FC ϵ R2/CD23 on normal human monocytes. *J. Exp. Med.* 167:1406-1416.
129. Vitté-Mony, I., R. Stancou, et J.H. Bertoglio. (1990). Functional consequences of c AMP accumulation in human natural killer cells: implications for IL-2 and IL-4 signal transduction. *J. Immunol.* 145:4272-4278.
130. Waldmann, T.A. (1991). The interleukin-2 Receptor. *J. Biol. Chem.* 266:2681-2684.
131. Waldschmidt, T.J., D.H. Conrad, et R.G. Lynch. (1988). The expression of B cell surface receptors. I. The ontogeny and distribution of the murine B cell IgE Fc receptor. *J. Immunol.* 140:2148-2154.
132. Wright, S.D., R.A. Ramos, P.S. Tobias, R.J. Ulevitch, et J.C. Mathison. (1990). CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS Binding Protein. *Science* 249:1431-1433.
133. Yasaka, T., L.A. Boreo, et R.N. Bachner. (1982). Monocyte aggregation and superoxide anion release in response to formyl-methionyl-leucylphenylalanine(FMLP) and platelet-activating factor (PAF). *J. Immunol.* 129:1939-1995.
134. Yodoi, J., et K. Ishizaka. (1979). Lymphocytes bearing Fc receptors for IgE. 1. Presence of human and rat lymphocytes with Fc ϵ receptors. *J. Immunol.* 122:2577-2588.